



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
LABORATORIO DE PARASITOLOGÍA

**Caracterización de la Estructura Genética Poblacional
de *Fasciola hepatica* Mediante Marcadores
Alozímicos y Microsatélites**

Memoria que presenta **D. Severo Vázquez Prieto** para optar al Grado de Doctor
por la Universidad de Santiago de Compostela

Santiago de Compostela, abril de 2012

Esperanza Paniagua Crespo, Profesora Titular de Parasitología del Departamento de Microbiología y Parasitología, y Román Vilas Peteiro, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Genética, Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “**Caracterización de la Estructura Genética Poblacional de *Fasciola hepatica* Mediante Marcadores Alosímicos y Microsatélites**” que, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela, presenta el Licenciado en Farmacia D. Severo Vázquez Prieto, ha sido realizada en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia bajo nuestra dirección y que, hallándose concluida, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

En Santiago de Compostela, a 23 de abril de 2012.

Fdo. Dra. Esperanza Paniagua Crespo

Fdo. Dr. Román Vilas Peteiro

AGRADECIMIENTOS

Aunque los años de trabajo dedicados a la elaboración de esta Tesis Doctoral no constituyan el final, ni siquiera el principio del fin, de este enredo en el cual he tenido el placer de sumergirme, tal vez puedan constituir, al menos, el final del principio. Sin embargo, no habría sido posible llegar a término tan aparentemente simple sin la colaboración de distintas personas a las cuales desearía expresar mi más sincera gratitud.

En primer lugar, a mis directores de Tesis, la Dra. Dña. Esperanza Paniagua Crespo y el Dr. D. Román Vilas Peteiro, por haber compartido conmigo todos sus consejos y enseñanzas, no solo académicas sino también humanas. Asimismo, debo agradecerles el respaldo, confianza y apoyo que me han otorgado a lo largo de cada una de las fases del desarrollo de este trabajo. El resultado final del mismo habría sido muy distinto si no hubiese contado con la cooperación de ambos.

A la Dra. Dña. Mercedes Mezo Menéndez y a la Dra. Dña. Marta González Warleta del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (A Coruña), por su participación directa en la obtención del material biológico, los adultos de *Fasciola hepatica*, utilizados en el presente estudio.

Al Dr. D. Paulino Martínez Portela, por permitirme acceder tan generosamente al Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria de Lugo. Asimismo, quiero hacer constar mi agradecimiento a todo el equipo de trabajo de Acuigen por compartir sus conocimientos, recomendaciones y generosa colaboración. En especial, a las personas que forman parte de su soporte técnico sin cuya ayuda no habría sido posible esta tarea.

A todos mis compañeros, así como profesores, del Laboratorio de Parasitología, por la enorme riqueza humana que han significado para mí los momentos compartidos.

A mis amigos, con quienes he crecido y compartido una larga etapa de mi vida, por ser los culpables de mi formación como ser humano. A todas aquellas personas que se han ido incorporando a mi existencia a lo largo de estos años, brindándome su alegría, confianza y amistad.

A mis padres, por su inmenso querer, protección y apoyo incondicional. Sin ellos no habría llegado a donde estoy. A mi familia, por estar siempre ahí.

A Lucía, por su continuo cariño, afecto y, sobre todo, paciencia, aún en las situaciones más difíciles. No me olvido de los momentos vividos.

A todos, gracias.

Este trabajo de investigación ha sido financiado por los Proyectos de Investigación titulados:

La fasciolosis bovina y ovina en Galicia. Estudio de prevalencias, posibles resistencias al triclabendazol y variabilidad genética de los parásitos, subvencionado por la Consellería do Medio Rural, Xunta de Galicia (PGIDIT04RAG503019PR).

***Fasciola hepatica*: estudio de variabilidad genética y caracterización molecular de antígenos de relevancia en diagnóstico y/o vacunación**, subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2006-13936-C02-01).

Nuevas estrategias en el diseño de vacunas empleando discriminación self-nonself: vacunas quiméricas poliepitópicas para el control de la fasciolosis en rumiantes, subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-22290-C03-01).

Diseño y construcción de antígenos quiméricos poliepitópicos empleando discriminación self-nonself. Aplicaciones al control de la fasciolosis en rumiantes, subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2011-30563-C03-01).

Durante su desarrollo, D. Severo Vázquez Prieto disfrutó de una beca para la realización de los estudios de tercer ciclo concedida por la Dirección Xeral de Ordenación e Calidade do Sistema Universitario de Galicia, así como del apoyo de la Consellería de Innovación e Industria mediante el Programa María Barbeito en el marco del Plan Galego de Investigación, Desenvolvemento e Innovación Tecnolóxica de Galicia-Incite.

PARTE DE LOS RESULTADOS QUE APARECEN EN LA PRESENTE MEMORIA SE HAN PUBLICADO, CONSTITUYENDO LOS SIGUIENTES ARTÍCULOS:

González-Díaz, H.; Pérez-Montoto, L.G.; Duardo-Sánchez, A.; Paniagua, E.; Vázquez-Prieto, S.; Vilas, R.; Dea-Ayuela, M.A.; Bolás-Fernández, F.; Munteanu, C.R.; Dorado, J.; Costas, J.; Ubeira, F.M. 2009. Generalized lattice graphs for 2D-visualization of biological information. *Journal of Theoretical Biology*, **261**: 136-147.

Vázquez-Prieto, S.; Vilas, R.; Mezo, M.; González-Warleta, M.; Ubeira, F.M.; Paniagua, E. 2011. Allozyme markers suitable for population genetic analysis of *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **176**: 84-88.

Vilas, R.; Vázquez-Prieto, S.; Paniagua, E. 2012. Contrasting patterns of population genetic structure of *Fasciola hepatica* from cattle and sheep: implications for the evolution of anthelmintic resistance. *Infection, Genetics and Evolution*, **12**: 45-52.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina difosfato
AMOVA	análisis de varianza molecular
ATP	adenosina trifosfato
<i>cox1</i>	subunidad 1 del citocromo <i>c</i> oxidasa
dNTP	desoxirribonucleótido trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	etilen glicol del ácido tetraacético
FCA	análisis factorial de correspondencias
Gp-P	glicoproteína P
HWE	equilibrio Hardy-Weinberg
ITS	espaciador transcrito interno
MLG	genotipo multilocus
MTT	dimetil tiazolil difenil tetrazolio bromuro
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido
<i>nad1</i>	subunidad 1 de la nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa
NADP	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
pb	pares de bases
PMS	metildibenzopiracina metil sulfato
RAPDs	ampliación aleatoria de secuencias polimórficas de ADN
SDS	dodecil sulfato de sodio
TBE	tris-borato-EDTA
TCBZ	triclabendazol
TCBZ.SO	triclabendazol sulfóxido
TE	tris-EDTA
Tris	tris (hidroximetil)-aminometano

«Me reservo el derecho a pensar de acuerdo con mis ideas actuales»

(Santiago Ramón y Cajal)

«Cree a aquellos que buscan la verdad. Duda de los que la encuentran»

(André Gide)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Aspectos del ciclo biológico que determinan la estructura genética de las poblaciones de parásitos	4
Medio acuático o terrestre.....	4
Movilidad del hospedador	6
Especificidad por el hospedador	7
Modo de reproducción	8
Número de hospedadores.....	12
Intensidad de parasitación	13
Formas de resistencia, diferencias en longevidad y tiempo de generación.....	14
Otras generalidades respecto a la estructura genética de poblaciones de helmintos parásitos.....	15
El enfoque genético poblacional en Parasitología	17
<i>Fasciola hepatica</i> : morfología y ciclo biológico	19
Estructura genética poblacional de <i>Fasciola hepatica</i> : hipótesis.....	23
Estructura genética poblacional de <i>Fasciola hepatica</i> : datos	24
Sobre la incidencia y el tratamiento de la fasciolosis	27
El problema de la resistencia al triclabendazol.....	29
El enfoque funcional.....	29
El enfoque genético poblacional	32
OBJETIVOS	35
MATERIAL Y MÉTODOS	39
Recolección y conservación de los parásitos.....	41
Enzimas analizadas y metodología electroforética	43
Marcadores microsatélites.....	49
Extracción del ADN	49

Amplificación mediante PCR.....	50
Genotipado de los loci microsatélites	52
Análisis de datos.....	53
Identificación de individuos clonales.....	53
Equilibrio Hardy-Weinberg y estimación de la variabilidad genética	55
Análisis de estructura genética poblacional.....	56
RESULTADOS	61
Variabilidad genética intrapoblacional	63
Diversidad genotípica y estructura clonal.....	69
Desviación del equilibrio Hardy-Weinberg y desequilibrio genotípico	72
Estructura poblacional y diferenciación genética	78
DISCUSIÓN	85
Estructura genética poblacional de <i>Fasciola hepatica</i> en ganado bovino y ovino	87
Implicaciones para la resistencia frente a antihelmínticos	97
CONCLUSIONES	101
ANEXO	105
BIBLIOGRAFÍA.....	117

INTRODUCCIÓN

El estudio de la forma en que la variabilidad genética se distribuye en el espacio geográfico, lo que se ha denominado el análisis de la estructura genética poblacional, resulta clave para la comprensión de la dinámica evolutiva de las especies. Mediante la consideración de determinados modelos matemáticos, tal estudio permite inferir la intensidad relativa con la que distintos factores evolutivos modifican las frecuencias alélicas a lo largo de sucesivas generaciones. Por ejemplo, la estimación de escasa diferenciación genética entre poblaciones relativamente distantes puede levantar sospechas sobre la participación de selección estabilizadora o la circulación entre aquellas de un alto grado de flujo génico. Por el contrario, la detección de alta divergencia interpoblacional es coherente con bajas tasas de flujo génico en relación con la deriva genética, entre otras hipótesis. Sin embargo, ciertas características de la biología de los organismos influyen en la actuación relativa de tales factores y, por lo tanto, contribuyen a la configuración de la estructura genética poblacional. Así, es evidente que la existencia de mecanismos de dispersión, tales como la presencia en el ciclo vital de una forma larvaria pelágica, aumentan las posibilidades de flujo génico, implicando homogeneidad en largas distancias.

El análisis de la estructura genética poblacional al que nos estamos refiriendo es posible mediante el uso de marcadores moleculares codominantes, tales como las alozimas y los microsatélites. Su condición de codominantes hace referencia a la posibilidad de distinción entre heterocigotos y homocigotos, lo cual simplifica el cálculo de frecuencias genotípicas. Las alozimas son distintas formas moleculares que catalizan una misma reacción enzimática y que presumiblemente son codificadas por distintos alelos en un locus. En la medida en que distintas alozimas sean discriminadas, por ejemplo mediante técnicas electroforéticas, podrán identificarse genotipos que servirán para estimar frecuencias genotípicas y alélicas en una o varias poblaciones y, así, llevar a cabo su descripción genética fundamental. Los microsatélites son secuencias de unos pocos nucleótidos que se repiten en tándem a lo largo de todo el genoma. Dado que las secuencias que flanquean a un microsatélite son singulares, este tipo de loci también pueden ser amplificados específicamente mediante PCR si se dispone de información *a priori* acerca de las secuencias flanqueantes. Los diferentes alelos en un locus microsatélite se definen por un número distinto del motivo de repetición,

de manera que pueden ser identificados en un análisis de fragmentos convencional, lo que permite la inferencia de los correspondientes genotipos. Con la estimación de frecuencias genotípicas y alélicas en distintas poblaciones se pueden calcular estadísticos que describen los niveles de variabilidad genética de las especies y cómo esta se distribuye a lo largo de su rango geográfico.

En el caso de los organismos parásitos, no cabe duda de que algunas de sus peculiaridades configuran la estructura genética poblacional, dotándola de una morfología singular que tendrá influencia en el modo en que sus poblaciones evolucionan y afrontan desafíos ambientales, tales como el deterioro del hábitat en el que viven sus hospedadores, el uso de fármacos antiparasitarios, etc. A continuación, revisaremos algunos de los principales estudios dedicados a analizar cómo la ingente diversidad de ciclos vitales que caracteriza a los organismos parásitos afecta a la estructura genética de sus poblaciones y, por ende, determina la dinámica evolutiva de los distintos linajes.

ASPECTOS DEL CICLO BIOLÓGICO QUE DETERMINAN LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE PARÁSITOS

MEDIO ACUÁTICO O TERRESTRE

En teoría, aquellas especies que desarrollan completamente su ciclo vital en el medio acuático (especies autogénicas) tienen una mayor capacidad de dispersión que las especies que maduran en hospedadores terrestres o aves ictiófagas y solo utilizan a los peces como hospedadores intermediarios o paraténicos (especies alogénicas) (Esch *et al.*, 1988). Así, resulta razonable esperar que las especies autogénicas presenten menor subdivisión genética en el espacio geográfico que las especies alogénicas, debido a mayores posibilidades de flujo génico. En consonancia con esta hipótesis, Criscione y Blouin (2004) estudiaron poblaciones de cuatro especies de digeneos que parasitan a salmónidos del género *Oncorhynchus* y observaron un grado de estructuración genética claramente inferior en las tres especies autogénicas en comparación con la cuarta especie, cuyo ciclo vital incluía hospedadores terrestres de gran movilidad. Generalizando sus resultados, Criscione y Blouin (2006) han sugerido que las especies de parásitos estrictamente

acuáticas, con varios hospedadores intermediarios en su ciclo vital, integran poblaciones esencialmente panmícticas, ya que dichas cualidades ofrecen amplias oportunidades para la mezcla de la progenie del parásito antes de su incorporación al hospedador definitivo, donde tiene lugar la reproducción sexual. Por lo tanto, en hábitats acuáticos, es previsible un alto grado de mezcla genética y, si existiese reproducción asexual, una baja transmisión agregada de clones a los hospedadores definitivos. Presumiblemente, tales poblaciones deberían caracterizarse por mostrar frecuencias genotípicas acordes con los valores esperados en el equilibrio Hardy-Weinberg (HWE), así como escasa diferenciación interpoblacional. Sin embargo, esta hipótesis se ha testado empíricamente muy pocas veces en el hospedador definitivo (Criscione y Blouin, 2006; Criscione *et al.*, 2011), realizándose la mayoría de los trabajos en hospedadores intermediarios secundarios (Rauch *et al.*, 2005; Keeney *et al.*, 2007a,b; Leung *et al.*, 2009). Todos estos estudios, no obstante, apoyan dicha hipótesis, pues se han detectado muy pocos clones (más del 89 % de los helmintos genotipados son genotipos únicos) y no se han observado desviaciones del HWE en las poblaciones estudiadas, excepto en las examinadas por Leung *et al.* (2009) que fueron atribuidas a la posible presencia de alelos nulos.

Una aparente excepción a la hipótesis de altos niveles de mezcla en poblaciones de helmintos parásitos con ciclo vital estrictamente acuático fue observada por Vilas *et al.* (2003) en el digeneo marino *Lecithochirium fusiforme*. Estos autores encontraron diferenciación alozímica moderada entre infrapoblaciones (conjunto de individuos de una especie que parasitan al mismo individuo hospedador), así como déficits significativos de heterocigotos a nivel infrapoblacional, cuya magnitud variaba considerablemente entre loci. Los autores sugirieron la posibilidad de que tales desviaciones del HWE fueran debidas al efecto Wahlund, causado por el hecho de que las infrapoblaciones estuvieran integradas por parásitos pertenecientes a grupos genéticamente diferenciados. Esta hipótesis fue experimentalmente comprobada mediante microsatélites por Criscione *et al.* (2011), evidenciándose tres grupos genéticamente diferenciados que podrían corresponder a sendas especies crípticas, cuya estructura, considerada individualmente, resultó coherente con la expectativa de panmixia y la alta mezcla de clones facilitada por un ciclo biológico acuático.

Los parásitos que presentan ciclos semiacuáticos con un hospedador definitivo terrestre, tales como *Schistosoma mansoni* y *Fascioloides magna*, tienen un alto riesgo de depositar sus huevos en un hábitat inadecuado para la transmisión, lo que aumenta la varianza en el éxito reproductivo entre genotipos y, por consiguiente, contribuye a explicar la baja diversidad genética observada (Mulvey *et al.*, 1991; Théron *et al.*, 2004; Prugnolle *et al.*, 2005c). Sin embargo, en especies puramente acuáticas la puesta siempre se produce en el agua, medio propicio para la dispersión de estadios larvales de tales especies (Criscione y Blouin, 2006). Además, en especies hermafroditas, las de transmisión acuática presentan mayores niveles de variabilidad genética que aquellas con ciclos vitales completamente terrestres, como *Echinococcus granulosus*, debido a que la mezcla facilitada por el medio acuático reduce las posibilidades de apareamiento entre individuos del mismo clon y, por tanto, de consanguinidad (Šnábel *et al.*, 1996; Lymbery *et al.*, 1997; Vilas y Paniagua, 2004; Criscione y Blouin, 2006).

MOVILIDAD DEL HOSPEDADOR

La diseminación de los parásitos depende de la movilidad y capacidad de dispersión de sus hospedadores, lo que condiciona la magnitud del flujo génico entre las poblaciones parasitarias y contribuye a dar forma a su estructura genética poblacional a escala local o regional (Blouin *et al.*, 1995; McCoy *et al.*, 2003a; Criscione y Blouin, 2004). Esta influencia será especialmente notable en parásitos con ciclos vitales directos y escasa capacidad de dispersión, donde la existencia de hospedadores móviles o vectores en el ciclo vital generalmente conduce a un elevado flujo génico entre las poblaciones parasitarias, reduciendo la diferenciación genética entre ellas. Por ejemplo, Blouin *et al.* (1995) examinaron la estructura genética de cinco especies de nematodos tricostrongílidos: cuatro de ellas parásitas de ganado doméstico y una de rumiantes salvajes. Todas las poblaciones estudiadas presentaron alta diversidad genética, pero solo los helmintos parásitos del ganado doméstico revelaron bajo grado de estructuración geográfica, coherente con alto flujo génico entre poblaciones. Los autores atribuyeron la falta de estructuración genética en los parásitos del ganado doméstico al transporte frecuente de este por parte de los ganaderos a lo largo del área geográfica estudiada. Resultados similares se observaron incluso en situaciones donde, *a priori*, se espera un alto grado de

estructuración genética como es el caso de las poblaciones de *Teladorsagia* en el archipiélago de Santa Kilda, geográficamente aisladas de otras poblaciones (Braisher *et al.*, 2004). No obstante, Leignel y Humbert (2001) detectaron subdivisión genética significativa entre poblaciones aisladas de *Teladorsagia circumcincta* que parasitan a ganado doméstico, posiblemente debido a diferencias de manejo del ganado en la zona.

La presencia de hospedadores que no favorecen la dispersión parasitaria contribuye a intensificar la estructuración genética y con frecuencia sus poblaciones se ajustan a un modelo de aislamiento por distancia. Por ejemplo, las poblaciones del nematodo *Heterorhabditis marelatus*, cuyos hospedadores son insectos de escasa movilidad, presentan menor variación genética y mayor subdivisión que las poblaciones de parásitos con hospedadores vertebrados (Blouin *et al.*, 1999). Asimismo, los platelmintos no parásitos integran, por lo general, poblaciones altamente estructuradas desde el punto de vista genético, incluso a escala microespacial, debido a sus limitadas posibilidades de dispersión (Hebert y Payne, 1985; Dynes *et al.*, 2001; Pongratz *et al.*, 2002). Evidentemente, la movilidad del hospedador también influye en la estructura genética del parásito a nivel infrapoblacional. Por ejemplo, en el archipiélago caribeño de Guadalupe, los hospedadores intermediarios de *S. mansoni* casi siempre están infectados por un solo genotipo, mientras que los hospedadores definitivos, ratas del género *Rattus*, albergan una amplia gama de genotipos parasitarios debido a su movilidad relativamente elevada (Barral *et al.*, 1996; Théron *et al.*, 2004). No obstante, el comportamiento territorial de este hospedador es un factor que potencialmente aumenta la estructuración genética a este nivel del ciclo vital (Sire *et al.*, 2001).

ESPECIFICIDAD POR EL HOSPEDADOR

El grado de especificidad por su hospedador que manifiestan los organismos parásitos afecta a los niveles de flujo génico parasitario entre las especies hospedadoras (Nadler, 1995; Criscione *et al.*, 2005; Poulin y Keeny, 2008), por lo tanto, es previsible que el modelo de estructura genética que presenten estos organismos varíe en función del espectro de especies hospedadoras que posean. Así, los parásitos que maduren sexualmente en un número restringido de especies hospedadoras es probable que muestren un escaso flujo génico interpoblacional.

Por el contrario, es razonable esperar que los parásitos generalistas integren poblaciones genéticamente más homogéneas en el espacio, pero a la vez más diversas, debido a la existencia de mayores oportunidades de flujo génico y de selección equilibradora. Sin embargo, las diferencias de comportamiento o ecológicas entre múltiples especies hospedadoras también pueden promover la estructuración genética en las poblaciones parasitarias, incluso si la especificidad de hospedador es baja, ya que tales diferencias afectan a la probabilidad de contacto entre hospedadores (McCoy *et al.*, 2001).

Generalmente, la dinámica demográfica y evolutiva de las especies parásitas que explotan un amplio espectro de hospedadores difiere de aquellas que solo infectan a una especie. Así, los parásitos especialistas suelen estar mejor adaptados localmente a sus hospedadores que los generalistas (Lajeunesse y Forbes, 2002). Además, los parásitos con un estrecho espectro de hospedadores están sometidos a eventos de extinción-recolonización con mayor frecuencia que las especies generalistas, sobre todo si parasitan a poblaciones pequeñas y fragmentadas como son las constituidas por muchos animales salvajes (Ericson *et al.*, 1999; Thrall *et al.*, 2001). Tales procesos demográficos pueden provocar la pérdida de la diversidad genética en las poblaciones parasitarias e incrementar su diferenciación a través de mayores efectos de deriva genética. Por el contrario, los parásitos capaces de infectar a múltiples especies no dependen de la dinámica poblacional de una única especie hospedadora, siendo menos probable que sus poblaciones sufran fluctuaciones extremas, lo que les permitiría mantener un mayor tamaño efectivo de población (Dobson, 2004; Barret *et al.*, 2008).

MODO DE REPRODUCCIÓN

El modo de reproducción influye directamente sobre la génesis y distribución de la variabilidad genética. En general, las especies que experimentan recombinación sexual presentan niveles más altos de diversidad genética que aquellas cuyo modo de reproducción es únicamente asexual (Huyse *et al.*, 2005); sin embargo, muchos parásitos exhiben tanto reproducción sexual como mecanismos de amplificación clonal. La importancia relativa de ambas formas de reproducción determinará la estructura genética poblacional del parásito. Así, las poblaciones de nematodos tricostrongílidos que se reproducen sexualmente son

desde el punto de vista genético más diversas y menos estructuradas que las de otros nematodos filogenéticamente relacionados que exhiben partenogénesis, tales como *Strongyloides*, ciertos parásitos de plantas y nematodos entomopatógenicos (Blouin, 1998; Anderson *et al.*, 1998). No obstante, en poblaciones predominantemente partenogenéticas de *Strongyloides ratti*, la mayor parte de la variación genética tiene lugar entre parásitos de un mismo hospedador definitivo, observándose una pequeña subdivisión genética entre distintas localidades geográficas, presumiblemente debido a la movilidad del hospedador, ratas del género *Rattus*, y a la reproducción sexual que ocurre ocasionalmente (Fisher y Viney, 1998).

En aquellas especies hermafroditas en las que predomina la autofecundación sobre la fecundación cruzada (Lymbery *et al.*, 1997), los niveles de variabilidad genética con frecuencia son inferiores a los observados en especies relacionadas con mecanismos que impiden o limitan la autofecundación (Šnábel *et al.*, 1996; Vilas y Paniagua, 2004; Criscione y Blouin, 2006). Por otra parte, en poblaciones de parásitos hermafroditas con baja intensidad de infección pueden incrementarse tanto la tasa de autofecundación como la probabilidad de consanguinidad, si tiene lugar la transmisión agregada de individuos genéticamente idénticos. Dado que las especies hermafroditas suelen recurrir a la fecundación cruzada siempre que les es posible, ya que la autofecundación sirve como recurso solo cuando no encuentran a otros congéneres en el hospedador definitivo, la estructura reproductiva de la población se verá influenciada por la dinámica de la transmisión parasitaria, la cual determinará la distribución de los parásitos en los hospedadores definitivos (Criscione y Blouin, 2006).

En *S. mansoni* se ha observado una estructura genética poblacional diferente según el sexo del parásito, de tal forma que la diferenciación genética entre infrapoblaciones es mayor en las hembras que en los machos. De acuerdo con el ciclo biológico y los excesos de heterocigotos detectados en las hembras con respecto a los valores esperados bajo panmixia, la estructura observada no pudo ser explicada únicamente por diferencias de dispersión del parásito según el sexo (Prugnolle *et al.*, 2002). Estudios posteriores demostraron que este modelo resulta de la interacción entre la alta variabilidad en el tamaño de prole, la existencia

de procesos selectivos y el sexo del hospedador (Prugnolle *et al.*, 2004, 2005a,b; Caillaud *et al.*, 2006).

La prevalencia e incidencia de la parasitosis también puede influir poderosamente en la estructura reproductiva de la población. Por ejemplo, el protozoo *Plasmodium falciparum* tiene que reproducirse sexualmente en el interior del vector antes de su transmisión al hospedador definitivo. En áreas geográficas de elevada prevalencia, las poblaciones parasitarias mantienen altos niveles de diversidad genética y una escasa diferenciación interpoblacional. En estas zonas es frecuente que múltiples genotipos del parásito infecten a un mismo vector, donde se aparearán y recombinarán antes de la transmisión a un nuevo hospedador. Por el contrario, en regiones donde la prevalencia de la parasitosis es relativamente baja, la probabilidad de que distintos genotipos se encuentren en el interior de un mismo vector es mucho menor, por lo que se produce frecuentemente la fecundación entre individuos genéticamente idénticos. En estas circunstancias, las poblaciones parasitarias presentan escasa diversidad genética y alta variación geográfica (Anderson *et al.*, 2000). No obstante, incluso en zonas altamente endémicas, este parásito puede estar lejos de constituir una unidad panmíctica e integrar, más bien, infrapoblaciones altamente divergentes (Razakandrainibe *et al.*, 2005).

Según Prugnolle y De Meeûs (2008), el efecto de la amplificación clonal puede variar ligeramente de un ciclo biológico a otro, conduciendo a diferentes modelos de estructura genética poblacional. Así, en parásitos que alternan la reproducción sexual y asexual en sus ciclos vitales, como los trematodos digeneos, cestodos como *Echinoccocus* o protozoos como *Plasmodium*, la reproducción asexual, si se produce en el estadio diploide, tiende a incrementar la frecuencia de heterocigotos en la población resultante y la diferenciación genética entre poblaciones con respecto a la población parental (Prugnolle *et al.*, 2005a,b); en cambio, si la amplificación clonal tiene lugar en la fase haploide, la heterocigosis no se verá alterada de manera sustancial. Por otro lado, en el caso de parásitos cuyos ciclos vitales no se caracterizan por la alternancia regular de modos de reproducción, como *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Trichomonas vaginalis* o *Giardia duodenalis*, y todos los miembros de sus poblaciones proceden de reproducción asexual, con el tiempo, aumenta la heterocigosis en los clones debido a mutaciones que se producen

en cada locus. La presencia de genotipos repetidos conduce a un exceso de heterocigotos con respecto a lo esperado bajo panmixia. Sin embargo, en el momento en que tenga lugar un proceso de reproducción sexual, el número de heterocigotos convergerá rápidamente hacia el valor esperado (Balloux *et al.*, 2003). Además, las poblaciones de parásitos con este tipo de ciclo tienden a mostrar una menor diferenciación genética que los organismos estrictamente sexuales.

La frecuencia de la transmisión agregada de los clones, así como la riqueza de los mismos, pueden influir en la estructura reproductiva de la población y en sus niveles de diversidad genética. Por ejemplo, tanto en *F. magna* como en *S. mansoni*, las infrapoblaciones en el hospedador definitivo se caracterizan por la presencia de genotipos multilocus (MLGs) idénticos, resultado de reproducción clonal (Mulvey *et al.*, 1991; Théron *et al.*, 2004). Así, a consecuencia de la abundante presencia de MLGs idénticos en las infrapoblaciones del hospedador definitivo, la mayor parte de la diversidad genética en *F. magna* se halló distribuida entre los hospedadores vertebrados. Sin embargo, la multiplicación asexual en *S. mansoni*, aunque incrementa ligeramente la diferenciación genética entre infrapoblaciones a escala local, no parece jugar un papel importante en la diversidad genética de estas, ya que la mayor parte de la variación genética se halló dentro de las infrapoblaciones (Sire *et al.*, 2001). Estas diferencias pueden deberse a la distribución agregada de las metacercarias de *F. magna*; sin embargo, las cercarias de *S. mansoni* se liberan en aguas poco profundas y penetran directamente en el hospedador definitivo, lo que contribuye a una mayor mezcla de genotipos.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Criscione y Blouin (2006) en un estudio sobre el trematodo *Plagioporus shawi*, pues hallaron un número muy pequeño de individuos genéticamente idénticos en el seno del hospedador definitivo. Este hecho sugiere baja varianza clonal en el éxito reproductivo y alto grado de mezcla de los clones antes de su transmisión al hospedador vertebrado. La transmisión agregada de individuos clonales puede causar grandes desviaciones del HWE, generalmente hacia un exceso de heterocigotos (Prugnolle *et al.*, 2005a; Criscione *et al.*, 2011; Vilas *et al.*, 2011). No obstante, también pueden darse déficits de heterocigotos si la transmisión agregada continúa en sucesivas generaciones, ya que se incrementa la probabilidad de apareamientos

consanguíneos. En el caso de los esquistosomas, la presencia de individuos genéticamente idénticos en el hospedador definitivo puede afectar a la proporción de sexos, ya que esta puede ser muy diferente dependiendo de si se tiene en cuenta el número de MLGs únicos o el número total de individuos. Una proporción sesgada de sexos, resultado de la existencia de formas de reproducción asexual, puede incrementar la competición sexual (May y Woolhouse, 1993; Morand *et al.*, 1993; Morand y Müller-Graf, 2000) y reducir el tamaño efectivo de población (Criscione y Blouin, 2005). Por supuesto, este se ve reducido directamente por la alta varianza en el número de copias de cada clon, que, además, puede aumentar las posibilidades de selección clonal (Arnold y Wade, 1984).

NÚMERO DE HOSPEDADORES

El aumento de complejidad del ciclo biológico del parásito que implica la presencia de hospedadores intermediarios puede contribuir a la mezcla de genotipos parasitarios antes de la formación de las infrapoblaciones en el hospedador definitivo. Por ejemplo, Rauch *et al.* (2005), estudiando poblaciones del digeneo *Diplostomum pseudospathaceum*, demostraron que la presencia de un segundo hospedador intermediario incrementa la diversidad genética de las infrapoblaciones en el hospedador definitivo, pues contribuye a mezclar los genotipos producidos asexualmente en el primer hospedador intermediario. Así, el segundo hospedador intermediario puede acumular diferentes genotipos de cercarias antes de ser ingerido por el hospedador definitivo, el cual probablemente se alimente de numerosos individuos parasitados. Luego, existen mayores oportunidades para que los genotipos parasitarios se dispersen y se mezclen antes de ser incorporados al hospedador definitivo, lo que reduce el riesgo de apareamiento entre individuos genéticamente idénticos. Además, los ciclos vitales heteroxenos generalmente involucran a hospedadores filogenéticamente diversos, por lo que es teóricamente posible que parte de la variabilidad genética de la población esté mantenida por selección equilibradora asociada a diferentes presiones selectivas impuestas por las distintas especies hospedadoras (Gower y Webster, 2004). En resumen, poblaciones de parásitos con ciclos vitales que involucran a un número de hospedadores relativamente elevado podrían albergar altos niveles de variabilidad genética, debido al incremento del flujo génico y a la posibilidad de eficacias

variables en relación con la heterogeneidad ambiental que la pluralidad de hospedadores implicaría.

Por otra parte, un ciclo de vida complejo también puede conllevar importantes fluctuaciones demográficas que reducirían el tamaño efectivo de población y, por ello, la variabilidad genética. Así, el contraste existente entre las altas fecundidades que habitualmente caracterizan a los helmintos parásitos y las altas tasas de mortalidad ocasionadas por una baja probabilidad de acceder al hospedador apropiado, de tal manera que únicamente una pequeña fracción de la población llegue a infectar al hospedador definitivo, es sin duda un factor que aumenta los efectos de la deriva genética. En la medida en que un mayor número de hospedadores, especialmente si son necesarios para que se complete el desarrollo del parásito (hospedadores intermediarios), disminuye la ratio entre el tamaño efectivo y el tamaño censal de la población, se producirán grandes fluctuaciones estocásticas en las frecuencias alélicas, que en último término conducirán a la fijación alélica y, por ende, a la pérdida de variabilidad (Hedrick, 2009).

INTENSIDAD DE PARASITACIÓN

La intensidad de parasitación es un factor que depende de la relación hospedador-parásito e influye en la evolución del parásito en la medida en que afecta al tamaño efectivo de población. En general, cuanto mayor es la intensidad de parasitación del hospedador definitivo, mayor será el tamaño efectivo de población, pues son mayores los grupos en los que tiene lugar la reproducción sexual que dará lugar a la siguiente generación (Criscione y Blouin, 2005). En otras palabras, cuanto menos fragmentada se encuentre la población de individuos reproductores, menores serán los efectos de la deriva genética sobre la población en su conjunto, básicamente, la pérdida de alelos y el aumento de las diferencias genéticas entre poblaciones. Un ejemplo de cómo la intensidad de parasitación influye en la estructura genética poblacional lo proporcionan ciertos nematodos con ciclo directo. La pérdida de genotipos heterocigotos que causa la consanguinidad es un fenómeno común en poblaciones de *Ascaris*, probablemente como consecuencia de una distribución agregada del parásito (Anderson *et al.*, 1995; Nadler *et al.*, 1995; Criscione *et al.*, 2010). Sin embargo, en ciertas regiones donde la intensidad de parasitación es particularmente elevada no se han observado desviaciones significativas

de las frecuencias genotípicas esperadas bajo panmixia (Ibrahim *et al.*, 1994). Por otro lado, otros nematodos con ciclos y modos de transmisión parecidos a los de *Ascaris*, como *Necator* o *Teladorsagia*, presentan estructuras genéticas poblacionales similares, aunque intensidades de parasitación mucho mayores (Anderson *et al.*, 1993; Nadler *et al.*, 1995; Anderson y Jaenike, 1997; Hawdon *et al.*, 2001). Para explicar este resultado se ha sugerido que el efecto sobre el tamaño efectivo de población causado por las diferencias en intensidad de parasitación es compensado por una mayor longevidad de los huevos de *Ascaris* (Hawdon *et al.*, 2001).

FORMAS DE RESISTENCIA, DIFERENCIAS EN LONGEVIDAD Y TIEMPO DE GENERACIÓN

La existencia en el ciclo vital del parásito de formas de resistencia que incrementen su longevidad, así como de aspectos que influyan en el tiempo de generación favoreciendo el solapamiento de generaciones en el hospedador, son factores que teóricamente aumentan la variabilidad genética de la población, pues provocan flujo génico entre generaciones que probablemente difieren en su composición genética. En este sentido, la existencia, por ejemplo, de hospedadores paraténicos, debería contribuir al incremento de diversidad genética y, tal vez, a una mayor homogeneización entre poblaciones. En el trematodo *L. fusiforme*, Vilas *et al.* (2003) atribuyeron la escasa diferenciación genética observada entre ciertas infrapoblaciones a la acumulación de diferentes genotipos parasitarios en pequeños peces que actuaban como hospedadores paraténicos antes de ser ingeridos por el hospedador definitivo. La existencia de hospedadores paraténicos también podría explicar los déficits de heterocigotos detectados en el hospedador definitivo, debido a la mezcla de muestras temporales genéticamente distintas de una población probablemente sometida a fuertes efectos de deriva genética (Vilas *et al.*, 2003; Criscione *et al.*, 2011).

Diferencias en la supervivencia de formas de resistencia pueden contribuir a un grado distinto de solapamiento intergeneracional y, por consiguiente, explicar distintas posibilidades de flujo génico temporal. A pesar de que la intensidad de parasitación de las especies de *Necator* es generalmente mucho más elevada que la de las especies de *Ascaris*, ambos nematodos revelan una estructura genética poblacional similar debido a que los huevos de las primeras son más frágiles y sensibles a la desecación, un fenómeno que potencialmente disminuye el tamaño

efectivo de población, lo que compensaría las diferencias en intensidad de parasitación (Hawdon *et al.*, 2001). Se ha sugerido que la pobre capacidad de supervivencia de *Dictyocaulus viviparus* en el pasto es un factor determinante a la hora de explicar el alto grado de estructuración genética que manifiestan sus poblaciones (Borgsteede *et al.*, 1994; Höglund *et al.*, 2006), similar al detectado generalmente en nematodos parásitos de plantas e insectos (Hugall *et al.*, 1994; Blouin *et al.*, 1999).

Los nematodos *Haemonchus contortus* y *T. circumcincta* constituyen otro ejemplo de cómo diferencias en longevidad y resistencia a condiciones ambientales contribuyen a explicar diferentes patrones de estructura genética en taxones estrechamente relacionados. El primero es un parásito muy prolífico, con corta expectativa de vida, prevalencia relativamente baja en regiones templadas y marcada variación estacional. Siendo menos prolífica, *T. circumcincta* tiene una mayor longevidad y está presente durante todo el año. Silvestre *et al.* (2009) observaron escasa diferenciación genética entre las poblaciones de *T. circumcincta*, en contraste con el alto grado de divergencia detectado en *H. contortus*. Dado que las poblaciones de *T. circumcincta* han permanecido aisladas desde su origen, el bajo grado de estructuración genética que manifestaron no se atribuyó a la existencia de flujo génico entre poblaciones sino, más bien, a un tamaño efectivo de población relativamente grande. Sin embargo, las poblaciones de *H. contortus* probablemente experimentan cuellos de botella recurrentes causados por la existencia de periodos desfavorables que disminuirían su tamaño efectivo, lo que explicaría su mayor diferenciación. Las fluctuaciones en el tamaño poblacional como consecuencia de cuellos de botella serían también las responsables de la fuerte estructuración en otros helmintos parásitos, tales como *Bothriocephalus acheilognathi* (Luo *et al.*, 2003) o *Camallanus cotti* (Wu *et al.*, 2009).

OTRAS GENERALIDADES RESPECTO A LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE HELMINTOS PARÁSITOS

La estructura genética poblacional resulta de la interacción entre el tamaño efectivo de población, que determina los efectos de la deriva genética, básicamente, la disminución de la variación dentro de las poblaciones y su incremento entre ellas;

el flujo génico, que es un agente homogeneizador; y la selección natural, que puede tanto aumentar como disminuir el grado de estructuración. De los ejemplos relatados anteriormente puede inferirse que las diferencias en el ciclo vital que afecten a estos tres factores fundamentales repercuten en la manera en que la variabilidad genética se distribuye en el espacio y en el tiempo, y, en este sentido, determinan la evolución de los distintos linajes. Sin embargo, en comparación con los invertebrados de vida libre, existen ciertas características comunes a los helmintos parásitos que influyen en su dinámica evolutiva de manera particular.

Los organismos parásitos se caracterizan, en general, por presentar ciclos vitales cortos, breves tiempos de generación y alta fecundidad. Asimismo, no son raros los modos de reproducción hermafrodita, partenogenética o asexual. Además, las poblaciones parasitarias se encuentran característicamente fragmentadas. La subdivisión de la población parasitaria en grupos de individuos reproductores que la existencia de infrapoblaciones implica, las importantes fluctuaciones demográficas causadas por el contraste entre fecundidades elevadas y mortalidades igualmente altas y la posibilidad de reproducción asexual son factores que explicarían fuertes efectos de deriva genética. En otras palabras, tales propiedades, características del modo de vida parasitario, reducirían el tamaño efectivo de población con respecto a organismos de vida libre con el mismo tamaño censal. Según esta hipótesis, los organismos parásitos deben constituir poblaciones genéticamente poco variables y altamente estructuradas, consecuencias fundamentales del proceso de deriva. De acuerdo con esto, Price (1977, 1980) propuso que las especies parásitas conforman, por lo general, poblaciones en gran medida homocigóticas y altamente diferenciadas entre sí, especialmente si la probabilidad de dispersión del parásito es baja.

El escenario descrito por Price resulta particularmente plausible si la progenie de una infrapoblación tiende a infectar al mismo individuo hospedador. Muchos de los ejemplos utilizados por Price son insectos fitófagos que pueden presentar generaciones recurrentes en una única planta hospedadora y, por consiguiente, la misma infrapoblación puede sufrir deriva genética a lo largo de sucesivas generaciones. Sin embargo, existe una enorme diversidad de ciclos vitales entre los organismos parásitos y se han relatado algunos ejemplos que

ilustran cómo aspectos cruciales, entre los que se incluyen el modo de reproducción y transmisión, así como el número, tipo y especificidad de hospedador, llegan a conformar la estructura genética poblacional. Así, la progenie de muchos parásitos cuenta con numerosas posibilidades para su mezcla y posterior incorporación a nuevos hospedadores definitivos, lo cual contribuye a aumentar sus niveles de variabilidad genética. De hecho, se ha comprobado que son muchos los helmintos parásitos que muestran niveles de diversidad alozímica y de ADN mitocondrial similares a los descritos en invertebrados de vida libre (Blouin *et al.*, 1992; Bush *et al.*, 2001; Criscione y Blouin, 2004).

EL ENFOQUE GENÉTICO POBLACIONAL EN PARASITOLOGÍA

El conocimiento de la estructura genética resulta fundamental a la hora de comprender los cambios evolutivos que se producen en el seno de las poblaciones parasitarias, es decir, los denominados procesos microevolutivos. El análisis de la variación genética y su distribución a distintos niveles es frecuentemente la única forma de estimar parámetros poblacionales ecológicamente relevantes, tales como los modos y estrategias de reproducción, la capacidad de dispersión o el tamaño efectivo de población. Asimismo, la estructura genética poblacional puede ser utilizada para inferir procesos epidemiológicamente relevantes o dilucidar aspectos ecológicos y evolutivos en los organismos parásitos (Nadler, 1995; Paterson y Viney, 2000; Criscione *et al.*, 2005; Archie *et al.*, 2009).

La observación directa de la dispersión parasitaria entre hospedadores es muy difícil debido al pequeño tamaño, localización y biología de los organismos parásitos (De Meeûs *et al.*, 2007). No obstante, el análisis de la estructura genética de las poblaciones parasitarias proporciona un método alternativo para dilucidar los modelos de transmisión, incluso a escala local (Criscione *et al.*, 2005; Archie *et al.*, 2009). Así, marcadores moleculares altamente polimórficos (v. g., los microsatélites) y potentes métodos de asignación poblacional (Manel *et al.*, 2005; Francois *et al.*, 2006) permiten examinar la existencia de distintos grupos genéticos de parásitos dentro de una población hospedadora (McCoy *et al.*, 2003b; Criscione y Blouin, 2006; Chevillon *et al.*, 2007), para después testar posibles correlaciones con factores ecológicos que podrían afectar a la distribución de la variación

genética dentro y entre estos grupos (Storfer *et al.*, 2007). La incorporación de los resultados de agrupación genética a las variables espaciales, epidemiológicas y ecológicas permite resaltar aquellos factores que afectan a los patrones de dispersión parasitaria (Criscione *et al.*, 2010).

A partir de la estructura genética de las poblaciones parasitarias se puede obtener información sobre la de sus hospedadores (Wirth *et al.*, 2005; Nieberding y Olivieri, 2007). Los organismos parásitos han sido ampliamente utilizados como marcadores biológicos en la discriminación de stocks de organismos marinos migratorios (MacKenzie y Abaunza, 1998; MacKenzie, 2002). En estos estudios, la presencia o ausencia de especies de parásitos ha servido para identificar el origen geográfico de sus hospedadores. Sin embargo, si la subdivisión genética del parásito es mayor que la del hospedador, los genotipos de aquel permitirían la identificación de la población de origen del hospedador, incluso con mayor precisión que el análisis del genotipo de este (Manel *et al.*, 2002; Criscione *et al.*, 2006). Las estructuras genéticas del parásito y el hospedador pueden ser muy diferentes debido, por ejemplo, a que el flujo génico sea distinto entre parásitos que entre hospedadores o a que la población hospedadora presente un tamaño efectivo de población diferente a la de los parásitos. De hecho, diversas especies de parásitos muestran un grado de estructuración genética igual o mayor que el de sus hospedadores (Nadler *et al.*, 1990; Mulvey *et al.*, 1991; Jobet *et al.*, 2000; Nieberding *et al.*, 2004; McCoy *et al.*, 2005; Prugnolle *et al.*, 2005c). Los organismos parásitos también pueden resultar útiles en la identificación de: 1) focos de transmisión en estudios epidemiológicos, 2) formas de dispersión del hospedador o zonas de alimentación en el caso de especies migratorias, y 3) unidades evolutivamente significativas (ESUs), que representan grupos de poblaciones genéticamente diferenciados con un potencial adaptativo específico (Criscione y Blouin, 2007).

La posibilidad de cambio sustancial en la composición genética de una población cualquiera, por ejemplo en la dirección de un fenotipo resistente, está determinada por la variabilidad genética que alberga la población. La distribución espacial y temporal de dicha variación genética poblacional se encuentra conformada por diferentes procesos que interactúan entre sí e influyen en la

selección de rasgos adaptativos. Por lo tanto, los estudios de estructura genética poblacional permiten obtener información sobre la magnitud de tales procesos que, a su vez, resulta útil en la elaboración de hipótesis sobre la evolución de rasgos adaptativos, tales como la resistencia a fármacos o el desarrollo de virulencia (v. g. Hawdon *et al.*, 2001; Koffi *et al.*, 2006; Churcher *et al.*, 2008; Silvestre *et al.*, 2009; Criscione *et al.*, 2010). En particular, el flujo génico y la deriva genética, dos procesos que generalmente ejercen efectos antagónicos en la estructura genética de las poblaciones, determinan la eficacia de la selección natural en la propagación de mutaciones favorables durante el transcurso de varias generaciones. Así, la selección direccional es más eficaz en poblaciones de gran tamaño que presentan un flujo génico elevado ya que, a medida que se incrementa el tamaño efectivo de población, la fluctuación aleatoria en la frecuencia alélica es menor. Además, la dispersión de la mutación se verá favorecida por la presencia de cualquier factor que incremente el flujo génico, sin embargo, este puede retardar la adaptación local cuando las presiones selectivas difieren entre poblaciones. Teniendo en cuenta estas variables fundamentales, se ha sugerido que el rápido desarrollo y extensión de las resistencias a los benzimidazoles en los nematodos tricostrongílicos de importancia veterinaria están causados por el gran tamaño efectivo de población y el alto flujo génico que presentan estas especies (Blouin *et al.*, 1995; Conder y Campbell, 1995).

FASCIOLA HEPATICA: MORFOLOGÍA Y CICLO BIOLÓGICO

Los adultos de *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea: Fasciolidae) presentan un cuerpo aplanado en forma de hoja, con un tamaño comprendido entre 20-50 mm de largo y 6-13 mm de ancho (Figura 1). En la parte anterior, muestran una proyección cónica característica, en cuyo extremo se observa una ventosa oral que rodea a la boca. Próxima a esta, en la base del cono, se localiza la ventosa ventral o acetábulo, algo mayor que la oral. De la boca parte una faringe muscular y prominente, seguida del esófago que se bifurca formando dos ramas laterales que se ramifican dendríticamente. El aparato reproductor masculino, que consta de dos testículos ramificados y situados en tándem, termina en un órgano copulador, el cirro, que se desenvaina durante la cópula para introducir el esperma en el poro genital femenino, situado junto al poro genital masculino, en un atrio genital común.

A un lado del útero se puede observar el ovario, una estructura arborescente de pequeño tamaño y forma digitada. Tanto el ovario como el útero confluyen hacia la zona media del cuerpo y se reúnen en el ootipo, rodeado por las glándulas de Mehlis que desembocan en él. A la zona ocupada por estas glándulas llegan los conductos vitelógenos que se disponen por todo el margen exterior del parásito. El tegumento, cubierto de espinas dirigidas hacia atrás que varían en tamaño y distribución, ayuda al parásito a mantener la homeostasis, esencial para la supervivencia dentro del hospedador definitivo, y desempeña una función en la absorción e intercambio de nutrientes y sustancias de desecho, así como en la regulación iónica y en la protección ante la reacción inmunológica del hospedador (Dangprasert *et al.*, 2001).

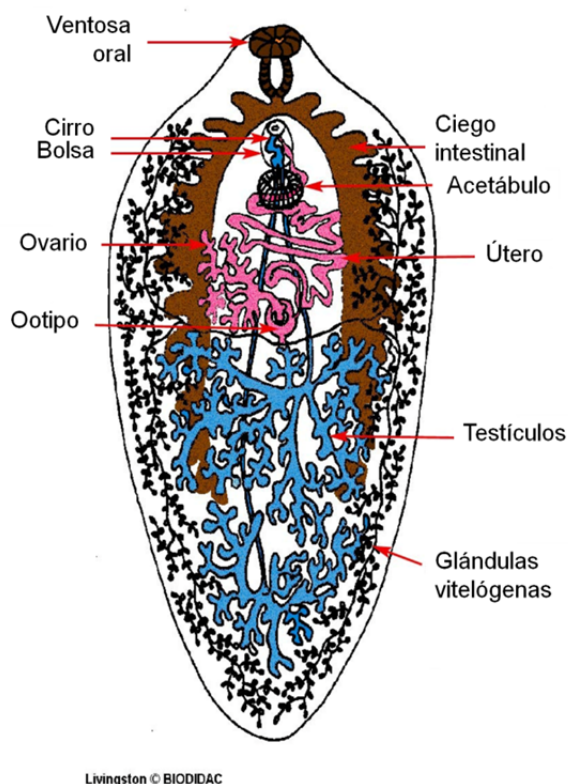


Figura 1. Morfología básica de un adulto de *Fasciola hepatica*.

Este helminto tiene una distribución mundial e infecta a numerosas especies de mamíferos, predominantemente al ganado bovino, ovino y caprino; sin embargo, tanto el ganado porcino como diversas especies de équidos y camélidos también pueden actuar como hospedadores definitivos. Asimismo, animales herbívoros salvajes como ungulados, lagomorfos y suidos son susceptibles a la infección. Otros animales y el hombre son considerados hospedadores definitivos accidentales, pudiendo desempeñar un papel importante en la transmisión del parásito (Mas-Coma *et al.*, 2005).

El ciclo biológico de *F. hepatica* es indirecto y complejo (Figura 2). Los huevos, depositados en los conductos biliares por las formas adultas, son arrastrados con las secreciones biliares al intestino delgado y posteriormente expulsados al medio externo con las heces del hospedador definitivo. Estos son de gran tamaño, oscilando entre 120-160 x 60-90 μm , de forma ovoide, operculados y de color pardo amarillento. En el momento de la puesta no están segmentados y, aunque pueden experimentar un desarrollo embrionario parcial en las heces, la culminación del mismo requiere la liberación del huevo de la masa fecal, normalmente facilitada por factores tales como las fuertes lluvias o la deposición de heces en agua. Los huevos pueden permanecer viables durante largos periodos de tiempo, desde tres semanas a varios meses. En condiciones favorables de temperatura, concentración de oxígeno y humedad tiene lugar en el huevo la apertura del opérculo y la liberación de una larva móvil denominada miracidio que, en un periodo máximo de 24 horas después de la eclosión, deberá alcanzar al hospedador intermediario, molusco gasterópodo de la familia Lymnaeidae. El miracidio penetra activamente en el caracol por la acción mecánica de su papila anterior y la secreción de enzimas proteolíticas (Smyth y Halton, 1983).

En el molusco, donde tiene lugar la multiplicación asexual del parásito, los miracidios se transforman en esporocistos, que constituyen el primer estadio larvario de *F. hepatica* generado en el hospedador intermediario, y a partir de sus células germinales se forman las redias, segundo estadio larvario. Finalmente, las redias dan lugar a las cercarias o, en condiciones adversas, a una segunda generación de redias, pudiendo incluso producirse hasta cuatro generaciones de estas (Rondelaud *et al.*, 2009). De cinco a siete semanas después de la infección,

las cercarias maduras abandonan activamente el caracol y en el medio externo se adhieren a la vegetación acuática a través de su ventosa oral, convirtiéndose en metacercarias por un proceso de enquistamiento. La resistencia de estas en el medio externo es muy alta y depende principalmente de las condiciones ambientales, especialmente de la humedad relativa, la temperatura y la luz solar directa (Boray y Enigk, 1964; Hodasi, 1971). Además, mantienen su viabilidad durante largos periodos de tiempo, aunque son muy sensibles a las altas temperaturas y a la desecación (Ashrafi *et al.*, 2006).

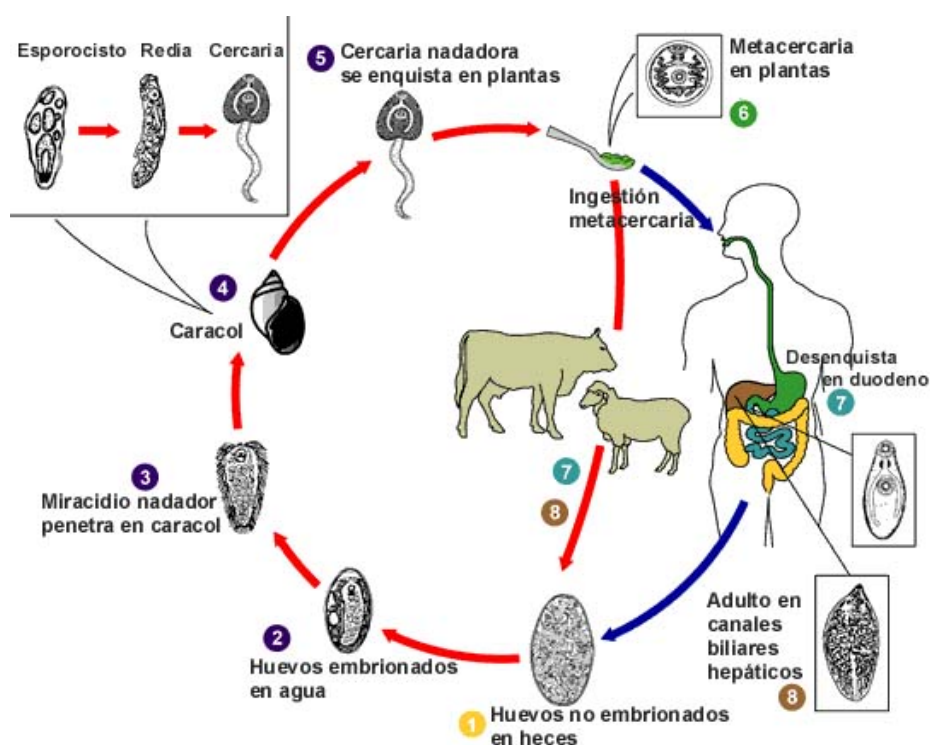


Figura 2. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*. Esquema modificado del publicado por el CDC (Centers for Disease Control and Prevention).

La infección del hospedador definitivo se produce cuando este ingiere pasto o agua contaminada con metacercarias en terrenos inundados, al borde de arroyos, pantanos o charcas. También, aunque las metacercarias son muy sensibles a la desecación que se origina durante el procesamiento de la hierba para su conservación,

es posible que la infección ocurra en estabulación mediante, por ejemplo, la alimentación con henos procedentes de ensilados incorrectos, donde las metacercarias pueden mantener su capacidad infectante. Parte de las metacercarias ingeridas por el hospedador definitivo mueren en el tracto gastrointestinal y son relativamente pocas las que logran alcanzar el estadio adulto. Aproximadamente una hora después de la ingestión, el parásito se desenquista en el intestino delgado. Este proceso se ve favorecido *in vitro* por la elevada concentración de dióxido de carbono, las condiciones reductoras y la alta temperatura, así como por la presencia de bilis, sales biliares y jugo gástrico (Dixon, 1966; Smith y Clegg, 1981; Sukhdeo y Mettrick, 1986).

Una vez desenquistadas, las formas inmaduras atraviesan la pared intestinal, migran por la cavidad peritoneal hasta perforar la cápsula de Glisson y acceden al parénquima hepático, donde pueden causar importantes lesiones. De ocho a diez semanas después de la infección, las formas juveniles alcanzan los conductos biliares donde adquieren la madurez sexual. Las fasciolas quedan adheridas a las paredes de los conductos biliares gracias a sus ventosas y espinas, provocando lesiones del epitelio y vasos sanguíneos. Es en esta localización donde tiene lugar la reproducción sexual y la formación de una nueva generación de huevos que serán arrastrados con la bilis al intestino y liberados al exterior a través de las heces. Ocasionalmente, se pueden producir infecciones ectópicas causadas por la migración de formas inmaduras a través de otros órganos diferentes al hígado.

ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE *FASCIOLA HEPATICA*: HIPÓTESIS

En teoría, una especie como *F. hepatica*, con un ciclo vital que involucra a un solo hospedador intermediario, caracoles con una capacidad de dispersión muy limitada, en cuyo interior se producen multitud de especímenes clonales, a su vez, de escasa movilidad, y que se enquistan en el pasto formando agregados de individuos emparentados que serán incorporados de manera conjunta al hospedador definitivo, debería caracterizarse por integrar infrapoblaciones que alberguen múltiples parásitos genéticamente idénticos, un factor que contribuiría a aumentar los índices de consanguinidad y a reducir el tamaño efectivo de población. Los presumiblemente bajos tamaños efectivos darían lugar a una pérdida de la

variabilidad genética dentro de las poblaciones del parásito y a un incremento de la divergencia interpoblacional. Tales efectos de deriva genética se verían recrudescidos si el modo de reproducción predominante en el hospedador definitivo fuese la autofecundación o bien la fecundación cruzada entre individuos clonales. No obstante, dados los niveles de variabilidad genética que se han detectado en ciertas poblaciones de *F. hepatica* (Agatsuma *et al.*, 1994; Hurtrez-Boussès *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2007, 2011a), el modo de reproducción predominante parece ser la fecundación cruzada, además de existir importantes niveles de flujo génico. Con todo, se han detectado casos de reproducción partenogenética en formas diploides y triploides, principalmente de origen asiático (Agatsuma *et al.*, 1994; Terasaki *et al.*, 1998, 2000); aunque también en Europa se ha hallado un aislado triploide que se reproduce mediante partenogénesis (Fletcher *et al.*, 2004).

Por otra parte, dado que la capacidad de dispersión intrínseca de *F. hepatica* es limitada, debido a su ciclo vital y a la extrema labilidad de sus formas larvarias, el flujo génico establecido entre las poblaciones del parásito estaría básicamente determinado por la movilidad del hospedador definitivo. Luego, si el efecto de la selección natural es pequeño y la tasa de mutación relativamente baja, el grado de diferenciación entre poblaciones será el resultado, básicamente, del equilibrio que se establezca entre la homogeneización ocasionada por el flujo génico y la diversificación causada por la deriva genética. Por lo tanto, si el tamaño efectivo es bajo y no existen importantes movimientos de ganado entre explotaciones, cabría esperar que las infrapoblaciones de distintas localidades geográficas difirieran de manera notable en su composición genética. Por el contrario, un elevado flujo génico interpoblacional favorecido, por ejemplo, por la mano del hombre, mantendría la homogeneización genética, retardando la adaptación del parásito a las condiciones ambientales si las presiones selectivas difiriesen entre poblaciones.

ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE *FASCIOLA HEPATICA*: DATOS

A pesar de la importancia de los estudios de estructura genética poblacional en el control eficaz de las enfermedades parasitarias, prácticamente no hay datos experimentales que permitan revelar la estructura genética de las poblaciones de *F. hepatica*. Esta carencia es particularmente sorprendente si se considera el

impacto de la fasciolosis en la salud humana y animal (Mas-Coma *et al.*, 2009), así como el rápido desarrollo de resistencias a antihelmínticos en este parásito. Se desconoce, por ejemplo, si las infrapoblaciones de adultos de *F. hepatica* contienen un alto número de clones y si estos tienen o no una distribución agregada entre hospedadores. Tampoco se han hecho estimaciones precisas de variabilidad genética poblacional y se ignora cómo esta se distribuye en el espacio geográfico. No obstante, existen razones para pensar que los niveles de variabilidad podrían ser más elevados de lo que se ha sospechado en un principio. Así, un estudio preliminar llevado a cabo con seis loci microsatélites en una población del parásito sugiere que las poblaciones de *F. hepatica* podrían contener una importante variabilidad genética y que la fecundación cruzada sería el modo de reproducción preferencial (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2004). Haciendo uso de marcadores RAPDs en tres especies hospedadoras, Vargas *et al.* (2003) demostraron un alto nivel de polimorfismo de *F. hepatica* tanto entre parásitos de la misma infrapoblación como de distintas infrapoblaciones. Utilizando este tipo de marcadores genéticos, Semyanova *et al.* (2003) analizaron la variación de poblaciones geográficamente aisladas, concluyendo que el 86,54 % de la diversidad genética total se debió a diferencias dentro de infrapoblaciones; el 8,16 % se atribuyó a diferencias entre infrapoblaciones de cada componente poblacional (conjunto de infrapoblaciones que parasitan a una misma especie hospedadora en una localidad geográfica determinada); y el 5,3 % restante a diferencias entre poblaciones. Estos resultados indican alta diversidad genética, así como una escasa, aunque significativa, diferenciación entre poblaciones. Además, los datos sugieren que cada individuo hospedador es infectado por numerosos parásitos genéticamente diferentes. Con todo, estos resultados deben tomarse con la debida precaución, ya que las muestras utilizadas son relativamente pequeñas para sacar conclusiones fiables desde un punto de vista poblacional. Además, los RAPDs no parecen los marcadores más adecuados para dilucidar la estructura poblacional del parásito, ya que su reproducibilidad se ha puesto en entredicho (v. g. Backeljau *et al.*, 1995) y se trata de marcadores dominantes, es decir, no permiten discernir directamente heterocigotos de homocigotos (Whitkus *et al.*, 1994; Backeljau *et al.*, 1995), por lo que la estimación de las frecuencias alélicas debe realizarse de manera indirecta, asumiendo HWE (Aagaard *et al.*, 1998).

Diferentes regiones del ADN ribosómico, en concreto, el ITS-1, ITS-2 y 28S, han sido ampliamente utilizadas en la caracterización molecular del género *Fasciola*, así como en el establecimiento de la diversidad genética intra e interespecífica (v. g. Adlard *et al.*, 1993; Mas-Coma *et al.*, 2001). Sin embargo, la mayor parte de estos estudios adoptan un enfoque taxonómico o macrogeográfico en lugar de una aproximación poblacional, esto es, microevolutiva. De hecho, son muy pocos los datos relevantes a este respecto. Alasaad *et al.* (2007) han demostrado una ligera variación entre las secuencias ITS-2 de especímenes de *F. hepatica* procedentes de distintas especies hospedadoras y de diversas localidades geográficas de España (1/362 pb; 0,3 %). Mediante una técnica molecular más sensible, la detección de polimorfismos de amplificación de secuencias relacionadas (SRAP), Alasaad *et al.* (2008) pusieron de manifiesto variación genética en poblaciones naturales procedentes de diferentes especies de hospedadores y de distintas localidades españolas. Sin embargo, el análisis estadístico asociado a este tipo de marcadores no permite un examen suficientemente exhaustivo de la estructura genética poblacional. En relación con la resistencia frente a antihelmínticos que manifiesta este parásito, Vara del Río *et al.* (2007) han desvelado que ciertas variaciones en un fragmento de 510 pb en el gen 28S del ADN ribosómico podrían estar correlacionadas con el fenotipo resistente, lo que probablemente permitiría el diagnóstico de un linaje particular.

Una serie de estudios han abordado el análisis de la variabilidad genética en poblaciones naturales de *F. hepatica* mediante el uso de ADN mitocondrial. Así, Semyenova *et al.* (2006) analizaron parte de las secuencias de los genes mitocondriales *nad1* y *cox1* en 20 poblaciones procedentes de distintas localidades del este de Europa y del oeste asiático. El análisis espacial de la diversidad genética sugiere escasa estructuración entre hospedadores o regiones, reflejando probablemente alto flujo génico. Un estudio desarrollado en Turquía también reveló altos niveles de diversidad genética en los loci *nad1* e ITS-1 a nivel infrapoblacional, tanto en parásitos de ganado bovino como ovino (Dosay-Akbulut *et al.*, 2005). En concordancia con tales niveles de variabilidad, Walker *et al.* (2007) demostraron que un individuo hospedador puede llegar a estar infectado por 10 haplotipos mitocondriales diferentes del parásito en menos de un año. Las principales consecuencias del alto nivel de diversidad observado, argumentan los autores, son

la frecuente probabilidad de desarrollo de resistencia a fármacos antihelmínticos y la rápida adaptación a los cambios ambientales en general. El mismo grupo de investigación ha demostrado recientemente en una población holandesa parasitando a ganado bovino que los haplotipos mitocondriales presentes en una granja pueden cambiar significativamente durante un periodo de 18 meses (Walker *et al.*, 2011a).

Aunque el valor de estos resultados es indudable para el conocimiento de la estructura genética de las poblaciones del parásito, lo cierto es que el análisis de datos mitocondriales tiene algunas limitaciones de importancia en comparación con marcadores codominantes, tales como alozimas o microsatélites (Ballard y Whitlock, 2004; Galtier *et al.*, 2009). Por ejemplo, aunque la variación se estudie en varios loci mitocondriales, en la práctica, representan un único marcador en la medida en que el genoma mitocondrial no recombina. Esto supone una seria dificultad en el estudio de la dinámica de transmisión del parásito cuando exige la identificación de individuos clonales.

SOBRE LA INCIDENCIA Y EL TRATAMIENTO DE LA FASCIOSIS

Las pérdidas económicas provocadas por la fasciolosis se estiman en miles de millones de dólares (Torgerson y Claxton, 1999), debido a que la infección puede causar la muerte prematura del ganado. Asimismo, los hígados infectados deben ser decomisados y se ven mermados importantes caracteres productivos tales como la cantidad de carne, leche o lana, dependiendo de la especie infectada. Además, es necesario añadir el gasto en profilaxis y tratamiento con antihelmínticos específicos. El impacto económico de la fasciolosis es particularmente importante en Galicia por diferentes motivos. En primer lugar, porque la cabaña bovina gallega, constituida por cientos de miles de cabezas, tiene un papel central en la economía del país, siendo la producción de leche y carne de vacuno el principal activo del sector ganadero. Por otro lado, las elevadas precipitaciones anuales y humedad ambiental, en combinación con las temperaturas moderadas que caracterizan al clima gallego, proporcionan las condiciones idóneas para el desarrollo del ciclo biológico del parásito (Morrondo Pelayo *et al.*, 1994). Además, el régimen de pastoreo intensivo y el tamaño típico de las explotaciones gallegas, generalmente familiares, ayudan a explicar la elevada prevalencia y carácter

endémico de la fasciolosis en Galicia, tanto en ganado ovino (Paz-Silva *et al.*, 2003) como bovino (Sánchez-Andrade *et al.*, 2000, 2002). Un estudio epidemiológico en 275 explotaciones de ganado bovino lechero en Galicia reveló que el 16 % de las reses sin síntomas de la enfermedad, procedentes del 61,1 % de las explotaciones estudiadas, presentaron antígenos específicos de *F. hepatica*, indicando infección activa por el parásito. Asimismo, se detectó la infección en el 42,9 % de los rebaños mantenidos en estabulación permanente, aunque la prevalencia e intensidad de infección fueron bajas (Mezo *et al.*, 2008). Estos valores de prevalencia pueden tener importantes repercusiones financieras. En Suiza se han calculado, en un marco de prevalencia media del 10,9 %, pérdidas económicas de aproximadamente 52 millones de euros anuales, lo cual representa una pérdida media de casi 300 euros por animal infectado (Schweizer *et al.*, 2005). Es preciso señalar que los efectos perjudiciales de la enfermedad están relacionados con el grado de infección, ocasionándose pérdidas significativas en la producción a partir de una prevalencia del 25 % dentro del rebaño o niveles de carga parasitaria iguales o mayores a 30 helmintos por hospedador (Vercruysse y Claerebout, 2001; Charlier *et al.*, 2007).

En la actualidad, la principal estrategia en la lucha contra la fasciolosis consiste en el uso de fármacos antiparasitarios. Desde su introducción a principios de los años 80 del siglo pasado, el triclabendazol (TCBZ) es el más utilizado debido a que es el único eficaz contra las formas juveniles y adultas (Boray *et al.*, 1983; Smeal y Hall, 1983; Turner *et al.*, 1984). Otros productos empleados en el tratamiento de la enfermedad son el albendazol, el clorsulón-ivermectina, el closantel o el nitroxinil; sin embargo, estos últimos no son activos frente a los estadios inmaduros del parásito. Aunque el TCBZ es un fármaco eficaz, en los últimos años se han detectado poblaciones resistentes en tres continentes: Oceanía, Europa y América del Sur (Overend y Bowen, 1995; Mitchell *et al.*, 1998; Moll *et al.*, 2000; Mooney *et al.*, 2009; Olacchia *et al.*, 2011). Asimismo, se han detectado poblaciones resistentes de *F. hepatica* a otros antihelmínticos (Fairweather y Boray, 1999), y registrado el primer caso de resistencia múltiple en este parásito (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2006). No todos los casos descritos en la literatura pueden ser atribuidos al desarrollo de una auténtica resistencia (Flanagan *et al.*, 2011), ya que existen otras causas que pueden dar lugar

al fallo terapéutico o la ausencia de eficacia del fármaco, entre las cuales podemos citar la incorrecta dosificación, el metabolismo reducido del fármaco a consecuencia del daño hepático en el hospedador, el empleo de inadecuados e incorrectos tests de diagnóstico o, incluso, la calidad variable de la formulación del fármaco (Fairweather, 2011).

Así pues, dado el potencial zoonótico de la enfermedad, la limitada variedad de fasciolícidas existentes en el mercado y la excesiva dependencia del TCBZ por parte de los ganaderos, parece lógico conjeturar que el uso de este fármaco podrá verse seriamente comprometido en un futuro cercano, haciéndose cada vez más difícil el control de la enfermedad. De hecho, ya se han propuesto algunas estrategias para afrontar esta situación (Fairweather, 2009), entre las que se incluyen la utilización de fasciolícidas alternativos, combinaciones sinérgicas de antihelmínticos y el desarrollo de nuevos fármacos (Alcalá-Canto *et al.*, 2006, 2007; Elitok *et al.*, 2006; Keiser *et al.*, 2006, 2007).

EL PROBLEMA DE LA RESISTENCIA AL TRICLABENDAZOL

Para afrontar el problema de las resistencias es preciso abordar el fenómeno desde, al menos, dos enfoques fundamentales. Por un lado, resulta esencial conocer el mecanismo molecular a través del cual el fármaco afecta a la integridad del parásito, conocimiento que permitirá determinar el modo de herencia de la resistencia y el diseño de fármacos alternativos. Por otro, un estudio poblacional que permita dilucidar la estructura genética de las poblaciones del parásito constituye una información fundamental para la predicción del comportamiento de las mutaciones responsables de la resistencia, lo cual supone una primera valoración cualitativa de las posibilidades de diseminación de esta. Este tipo de análisis resulta básico en el diseño de modelos cuantitativos que servirán para determinar la dinámica espacio-temporal de la resistencia.

EL ENFOQUE FUNCIONAL

El TCBZ pertenece a la familia de los benzimidazoles, antihelmínticos de amplio espectro que con su unión a la β -tubulina causan la despolimerización de los microtúbulos y, por consiguiente, la inhibición de aquellos procesos en los

que se ven involucrados (Lacey, 1988). Así, en estudios *in vitro*, el triclabendazol sulfóxido (TCBZ.SO) bloquea el movimiento de los cuerpos secretores desde los cuerpos celulares a la superficie apical del tegumento (Stitt y Fairweather, 1994), provocando el desprendimiento generalizado de este en el parásito adulto (Stitt y Fairweather, 1993). Del mismo modo, el TCBZ.SO inhibe la división mitótica de las células vitelógenas, espermatogénicas y oogoniales, reduciendo el número de espermatozoides producidos y alterando la formación de huevos (Stitt y Fairweather, 1992, 1996; Hanna *et al.*, 2010). Además, el tratamiento de los ejemplares de *F. hepatica* susceptibles al TCBZ con TCBZ.SO conduce a la pérdida de la inmunorreactividad de la tubulina en el sincitio tegumentario (Robinson *et al.*, 2002).

La resistencia a benzimidazoles mostrada por varias especies de nematodos se ha atribuido a la sustitución del aminoácido fenilalanina por tirosina en la posición 200 del isotipo-1 de la molécula de la β -tubulina (Kwa *et al.*, 1994). Esta mutación causa una alteración de la conformación tridimensional de la proteína, limitando su interacción con el fármaco (Lubega y Prichard, 1991), y parece seguir un modo de herencia mendeliana de tipo recesivo (Le Jambre *et al.*, 1979; Herlich *et al.*, 1981). Aunque otras mutaciones en el isotipo-1 de la β -tubulina han sido asociadas a la resistencia a los benzimidazoles, tales como la sustitución de fenilalanina por tirosina en la posición 167 y el reemplazo del ácido glutámico por alanina en la posición 198 (Prichard, 2001; Ghisi *et al.*, 2007), el polimorfismo en la posición 200 parece ser el determinante genético más comúnmente asociado a dicha resistencia.

Robinson *et al.* (2002) sugieren que el mecanismo de resistencia de *F. hepatica* difiere del de los nematodos, debido a que no se han detectado diferencias en la estructura primaria de la β -tubulina entre individuos resistentes y susceptibles. En ambos casos, el aminoácido que ocupa la posición 200 de la cadena polipeptídica es la tirosina, aunque es posible que existan varios isotipos de la β -tubulina que difieran en su afinidad por el TCBZ. Sin embargo, en los seis isotipos de la β -tubulina secuenciados hasta el momento en *F. hepatica* no se han hallado diferencias entre individuos resistentes y susceptibles al TCBZ (Ryan *et al.*, 2008), ya que ambos tipos presentaron los mismos aminoácidos en las posiciones

implicadas en la resistencia a los benzimidazoles. Así, los seis isotipos presentaron en las posiciones 167 y 198 fenilalanina y ácido glutámico respectivamente, y en la posición 200, tres isotipos mostraron tirosina, dos fenilalanina y uno leucina. No obstante, fueron observadas algunas diferencias en otras posiciones aminoacídicas, aunque permanece sin aclarar si estos cambios están asociados al fenotipo resistente.

Según el modelo molecular que explica la unión de los benzimidazoles a la β -tubulina en parásitos nematodos (Robinson *et al.*, 2004b), la presencia de la tirosina en la posición 200 en ejemplares de *F. hepatica* susceptibles al TCBZ podría impedir, mediante la formación de puentes de hidrógeno, el acceso de los benzimidazoles clásicos al sitio de unión de la β -tubulina y explicar, en parte, la actividad mínima o nula de muchos antihelmínticos benzimidazólicos contra *F. hepatica*. A su vez, el modelo propuesto sugiere que los benzimidazoles no actúan causando la despolimerización de los microtúbulos, sino mediante el bloqueo de los monómeros de la β -tubulina en su conformación abierta, interfiriendo así en la formación de los heterodímeros con las α -tubulinas.

En la actualidad, numerosos estudios aportan evidencias de que los sistemas enzimáticos de metabolización podrían estar alterados o sobreexpresados en los individuos de *F. hepatica* resistentes al fármaco. En este punto se ha señalado que la flavin monooxigenasa y el citocromo P-450 son los responsables fundamentales de la metabolización del TCBZ en sus principales metabolitos activos (Mottier *et al.*, 2004; Virkel *et al.*, 2006) y se ha demostrado que esta actividad metabólica es significativamente mayor en las cepas resistentes (Robinson *et al.*, 2004a; Álvarez *et al.*, 2005). Además, una serie de experimentos *in vitro* (Devine *et al.*, 2009, 2010a,b,c, 2011a,b) e *in vivo* (Devine *et al.*, 2011c, 2012) han mostrado que es posible modular la susceptibilidad de una cepa resistente de *F. hepatica* mediante la incubación del TCBZ y TCBZ.SO con inhibidores metabólicos, tales como el ketoconazol, el butóxido de piperonilo o el metimazol. Así, mientras que el tratamiento por separado con TCBZ o TCBZ.SO provoca una mayor alteración en los ejemplares susceptibles que en los resistentes, la incubación de estos compuestos con alguno de los inhibidores metabólicos anteriores potencia la acción farmacológica en los individuos resistentes a un nivel mucho mayor que el ocasionado en los susceptibles.

Otros procesos relacionados con la dinámica del fármaco en los tejidos parasitarios también pudieran contribuir al desarrollo de la resistencia. Así, se ha demostrado que mientras la absorción del TCBZ y el TCBZ.SO en las cepas resistentes es significativamente menor que en las susceptibles (Álvarez *et al.*, 2005; Mottier *et al.*, 2006), la absorción del albendazol es similar en ambos tipos (Mottier *et al.*, 2006). Este resultado sugiere que el mecanismo de resistencia es específico para el TCBZ, pudiendo estar implicada una proteína transportadora de membrana, la glicoproteína-P (Gp-P), que impediría a la molécula antiparasitaria alcanzar concentraciones activas en el lugar de acción. La sobreexpresión de la Gp-P se ha relacionado con el desarrollo de resistencias frente a diferentes clases de antihelmínticos (Wolstenholme *et al.*, 2004; Prichard y Roulet, 2007; James y Davey, 2009; Messerli *et al.*, 2009) y, aunque un cambio en la actividad de la Gp-P puede representar un mecanismo no específico, es probable que juegue un papel significativo en el desarrollo de la resistencia al TCBZ. Además, experimentos llevados a cabo con inhibidores de la Gp-P han revelado la posibilidad de revertir el estatus de las cepas resistentes (Mottier *et al.*, 2006), así como de incrementar la biodisponibilidad de los metabolitos del TCBZ en ovinos (Lifschitz *et al.*, 2009). Asimismo, se ha demostrado que la incubación del TCBZ.SO con R (+)-verapamilo, otro inhibidor de la Gp-P, provoca una alteración severa del tegumento en las cepas resistentes, mayor incluso que la sufrida por las sensibles tratadas únicamente con TCBZ.SO (Fairweather *et al.*, 2008).

EL ENFOQUE GENÉTICO POBLACIONAL

El conocimiento de la estructura genética de las poblaciones de *F. hepatica* resulta básico a la hora de valorar las posibilidades de desarrollo y extensión de resistencias a fármacos antihelmínticos, tales como el TCBZ. Dicho conocimiento, inferido del análisis de la variación presumiblemente neutral, es en este sentido relevante en cuanto que permite la relación con las tasas de flujo génico y el tamaño efectivo de población. Además, junto con la clarificación del modo de reproducción del parásito, es posible establecer una serie de predicciones cualitativas en relación con la dinámica evolutiva de mutaciones que confieran resistencia al TCBZ. Por ejemplo, si se confirmaran evidencias que sugirieran un tamaño efectivo relativamente pequeño, resultaría previsible que la dinámica

poblacional de la variante resistente estuviese determinada más por la deriva genética que por la selección natural, incluso si la presión de selección fuese importante (Hedrick, 2009). Esto significa que, simplemente por azar, la mutación podría llegar a fijarse rápidamente en unas poblaciones y no en otras que están siendo igualmente tratadas. Semejante estructura poblacional, caracterizada por la subdivisión genética, implicaría además una menor probabilidad de extensión de la resistencia y una mayor probabilidad de pérdida de la misma. Por otro lado, si el tamaño efectivo fuese grande, la variabilidad genética muy probablemente sería mayor y la selección más eficaz, mientras que el efecto de deriva devendría despreciable. En esta situación, la frecuencia de los alelos de resistencia podría incrementarse rápidamente y la población sería mayoritariamente resistente en un tiempo relativamente breve. Dado que el flujo génico es una fuerza que se opone tanto al efecto de la deriva genética como al de la selección diversificadora, se trata de un factor que potencialmente aumenta las probabilidades de diseminación de la resistencia. Sin embargo, si el flujo génico fuese marcadamente direccional, de tal manera que procediese esencialmente de poblaciones donde no existen alelos de resistencia, la velocidad con la que aumentaría la resistencia en la población que los contiene podría verse ralentizada, pues el flujo génico se opondría entonces a la adaptación local a través de la ruptura por recombinación de complejos génicos coadaptados (v. g., genes implicados en el fenotipo resistente).

Ciertos aspectos del ciclo biológico de *F. hepatica*, tales como una supuesta distribución no aleatoria del parásito en el pasto y su transmisión agregada, ejercen una importante influencia, especialmente si la mutación resistente fuese recesiva. Según Cornell *et al.*, (2003), la transmisión agregada del parásito promueve la extensión preferente de genes recesivos raros, posibilitando que un rasgo completamente recesivo pueda extenderse en la población tan rápidamente como uno parcial o completamente dominante. El modo de reproducción del parásito potenciaría este efecto en la medida en que contribuyese a una mayor homocigosis. Por otro lado, la laxa especificidad de *F. hepatica* respecto a su hospedador definitivo posibilita que animales herbívoros salvajes actúen como refugio para fenotipos resistentes al TCBZ, lo que puede contribuir a la extensión de la resistencia entre granjas (Walker *et al.*, 2011b).

Este tipo de especulaciones representan algunos ejemplos de razonamiento guiado por la perspectiva evolutiva, que traemos a colación, tal vez prematuramente, para ilustrar su aplicabilidad en la problemática particular que supone la resistencia frente a antihelmínticos. Esta forma de razonamiento es análoga a la realizada en párrafos anteriores, allí donde las peculiaridades del ciclo vital del parásito fueron examinadas en consonancia con su capacidad de conformación de la estructura genética poblacional. De igual manera que a la luz de un ciclo de vida conocido pudo entonces postularse un patrón de estructura genética, ahora pueden derivarse del mismo aquellas implicaciones para el comportamiento de una mutación favorecida por la selección natural. Es en estos argumentos donde precisamente radican las principales hipótesis asociadas a la tarea experimental llevada a cabo.

OBJETIVOS

La capacidad de respuesta de una población parasitaria frente a presiones selectivas, como las impuestas por el tratamiento con fármacos antihelmínticos, depende de sus niveles de variabilidad genética y de cómo esta se distribuye entre hospedadores y a lo largo del espacio geográfico, es decir, de su estructura genética poblacional. Sin embargo, hasta la fecha, la mayor parte de los estudios genéticos llevados a cabo con poblaciones naturales de *F. hepatica* han supuesto el análisis de marcadores altamente conservados, útiles para la caracterización taxonómica, pero que apenas aportan información a escala microespacial. Por otro lado, es sabido que la arquitectura genética de las poblaciones parasitarias está influenciada por la biología del hospedador, así como por aspectos fundamentales del ciclo biológico del parásito. Por ejemplo, en trematodos digeneos, la reproducción clonal en el primer hospedador intermediario afecta a la distribución de la variabilidad genética dentro y entre hospedadores definitivos. En particular, la variación en el éxito reproductivo de los clones puede disminuir el tamaño efectivo de la población del parásito e incrementar la diferenciación entre hospedadores definitivos. Así, tanto la abundancia de clones como su transmisión son aspectos importantes a la hora de entender cómo se organiza la diversidad genética en este grupo de parásitos y sus implicaciones evolutivas.

En el presente estudio, nos hemos propuesto analizar, mediante el uso de dos tipos de marcadores genéticos codominantes ampliamente utilizados en genética de poblaciones, la estructura genética poblacional de *F. hepatica* con el fin de obtener información fundamental en una discusión teórica sobre las posibilidades de desarrollo y diseminación de resistencias al TCBZ en el noroeste de España. Asimismo, hemos querido investigar la estructura genética poblacional del parásito en relación con su especie hospedadora. Por todo ello, nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Calcular mediante el uso de loci microsatélites y alozímicos polimórficos el grado de variación genética de distintas poblaciones geográficas de *F. hepatica* en el noroeste de España.
2. Determinar la existencia de posibles clones en las dos especies de hospedadores definitivos estudiadas (vacas y ovejas), así como su impacto en la estructura genética de la población.

3. Averiguar si el parásito integra poblaciones panmícticas y si una supuesta fecundación cruzada predominante tiene lugar con alta probabilidad entre individuos pertenecientes a un mismo clon.
4. Dilucidar la estructura genética de poblaciones de *F. hepatica* que parasitan a vacas y ovejas, además de estimar el grado de diferenciación genética entre poblaciones bovinas de este parásito en el noroeste de España.
5. Analizar los resultados obtenidos en relación con la dinámica evolutiva de posibles resistencias al TCBZ en el contexto geográfico estudiado.

MATERIAL Y MÉTODOS

RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS PARÁSITOS

Los especímenes adultos de *F. hepatica* destinados a este estudio fueron obtenidos de hígados de vacas sacrificadas en distintos mataderos de la provincia de A Coruña, así como de hígados de ovejas sacrificadas *in situ*, durante el período comprendido entre octubre de 2004 y septiembre de 2008. Un total de 587 ejemplares fueron recolectados a partir de 20 hospedadores, 10 vacas ($N = 438$) y 10 ovejas ($N = 149$), procedentes de diferentes explotaciones ganaderas situadas en el noroeste de España: Cerceda (CCD), Mabegondo (MBO), Abegondo (ABG), Mesía (MES), Melide (MEL), Guntín (GUN), Cervantes (CER), Bóveda (BOV1 y BOV2), Chantada (CHAN) y Colunga (COL) (Figura 3). Cada una de las vacas estudiadas pertenecía a una granja diferente, por lo que todos los parásitos de cada hospedador (infrapoblación) pueden ser considerados muestras de diferentes poblaciones geográficas. Solo los parásitos obtenidos de dos hospedadores bovinos procedieron de dos granjas situadas en la misma localidad (BOV1 y BOV2). Así, se analizaron muestras procedentes de un total de 11 granjas, 10 de las cuales fueron explotaciones de ganado vacuno.



Figura 3. Localización de los distintos puntos de muestreo.

La única granja de ovejas estudiada se ubica en Mabegondo y, puesto que todas las ovejas pertenecían al mismo rebaño y compartían pastos, sus infrapoblaciones pueden ser consideradas diferentes muestras de una única población geográfica. Además, con el fin de realizar un análisis preliminar de la variación alozímica que permitiese la selección de marcadores polimórficos, se llevó a cabo un primer estudio para el cual se recolectaron 110 adultos en tres vacas procedentes de otras tantas granjas situadas en las localidades gallegas de Valdoviño (VAL), O Corgo (COR) y As Nogais (NOG) (Figura 3). En cada hospedador individual fueron extraídos todos los ejemplares adultos, de modo que el tamaño de cada infrapoblación proporciona información sobre la carga parasitaria.

Los parásitos vivos, inmersos en solución salina fisiológica glucosada al 2 %, fueron transportados al laboratorio a una temperatura entre 37 °C y 40 °C. Después de sucesivos lavados, una pequeña fracción del extremo posterior de cada individuo fue seccionada y almacenada individualmente en tubos con etanol de 95°. De esta manera, se redujeron al mínimo las posibilidades de que los fragmentos destinados al análisis de ADN contuviesen una porción de útero o de vesícula seminal y, por tanto, se redujo el riesgo de contaminación genotípica procedente de los huevos fertilizados o del esperma almacenado. Estas muestras, adecuadamente etiquetadas, se guardaron hasta el momento de su utilización en recipientes especiales para su conservación en una cámara fría a 5 °C. La porción restante de cada individuo se depositó en tubos de plástico, debidamente etiquetados y clasificados según su población de origen, para su almacenamiento y conservación en un congelador a -80 °C hasta el momento en que se analizaron mediante electroforesis alozímica. Los individuos correspondientes a las muestras VAL, COR y NOG fueron congelados a -80 °C, ya que únicamente fueron utilizados en el estudio alozímico preliminar.

Antes del procesamiento electroforético, a cada tubo se le añadieron 350 µl de solución homogeneizadora (50 ml de agua destilada, 50 µl de β-mercaptoetanol, 50 µl de Triton-X-100 y 5 mg de NADP) y tres perlas de vidrio, para llevar a cabo la homogeneización mecánica de las muestras mediante un homogeneizador automático de tejidos (MagNA Lyser Instrument®) durante 20 segundos a una

velocidad de 6 500 revoluciones por minuto (rpm). Inmediatamente después, los tubos fueron centrifugados cinco minutos a 9 000 rpm en una centrifuga refrigerada a 4 °C. Los sobrenadantes obtenidos fueron distribuidos en alícuotas de 15-20 µl en tubos de fondo cónico y congelados a -80 °C hasta el momento de su utilización, tiempo de conservación que en ningún caso superó las cuatro semanas.

ENZIMAS ANALIZADAS Y METODOLOGÍA ELECTROFORÉTICA

En las tres primeras infrapoblaciones (VAL, COR y NOG), utilizadas solamente en el estudio preliminar, se ensayaron un total de 17 sistemas enzimáticos (Vázquez-Prieto *et al.*, 2011), elegidos de entre los previamente estudiados en otros trematodos (Vilas *et al.*, 2002a, 2004). De estos, 13 ofrecieron patrones electroforéticos interpretables, según los cuales tales enzimas están presuntamente codificadas por 16 loci (Tabla 1). Los estudios de estructura genética poblacional, llevados a cabo con las otras 11 poblaciones, se realizaron únicamente con los siete loci alozímicos que resultaron polimórficos, según el criterio del 95 %, en alguna de las tres infrapoblaciones previamente estudiadas. Estos loci son: *Aco*, *Ak*, *Got-1*, *Hk*, *Idh*, *Pgd* y *Pgm-2*. Aunque el locus *Pgm-1* exhibió escaso polimorfismo, se incluyó en los análisis posteriores debido a que siempre era posible su interpretación en los geles junto con el locus *Pgm-2*, altamente polimórfico.

La técnica empleada fue la electroforesis en gel de almidón al 10 %. En la realización de las electroforesis se siguieron esencialmente las metodologías descritas por Harris y Hopkinson (1976), Richardson *et al.* (1986) y Pasteur *et al.* (1987), adaptándolas a las necesidades de nuestro estudio, esto es, introduciendo pequeñas modificaciones de acuerdo con una estrategia de optimización de los resultados. Los tampones y las condiciones eléctricas empleados en la resolución de cada sistema enzimático se recogen en la Tabla 2. En todos los casos, excepto en las enzimas AK, HK y PGD, los tampones fueron continuos, siendo el tampón del gel el resultado de la dilución del tampón de electrodos.

Tabla 1. Sistemas enzimáticos interpretables y loci resultantes.

Enzima	Abreviatura	Código	Locus
Aconitasa	ACO	E.C. 4.2.1.3	<i>Aco</i>
Adenilato quinasa	AK	E.C. 2.7.4.3	<i>Ak</i>
Enzima málico	ME	E.C. 1.1.1.40	<i>Me</i>
Fumarasa	FH	E.C. 4.2.1.2	<i>Fh</i>
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	GPD	E.C. 1.1.1.49	<i>Gpd</i>
Glucosa fosfato isomerasa	GPI	E.C. 5.3.1.9	<i>Gpi</i>
Glutamato deshidrogenasa	GDH	E.C. 1.4.1.3	<i>Gdh</i>
Glutamato oxalacetato transaminasa	GOT	E.C. 2.6.1.1	<i>Got-1</i> <i>Got-2</i>
Hexoquinasa	HK	E.C. 2.7.1.1	<i>Hk</i>
Isocitrato deshidrogenasa	IDH	E.C. 1.1.1.42	<i>Idh</i>
Malato deshidrogenasa	MDH	E.C. 1.1.1.37	<i>Mdh-1</i> <i>Mdh-2</i>
Fosfoglucomutasa	PGM	E.C. 5.4.2.2	<i>Pgm-1</i> <i>Pgm-2</i>
Fosfogluconato deshidrogenasa	PGD	E.C. 1.1.1.44	<i>Pgd</i>

Los geles elaborados en moldes de metacrilato se guardaron en una cámara refrigerada a 4 °C, hasta el momento de su utilización al cabo de unas pocas horas. Antes de cargar cada gel, se practicaba en el mismo una línea horizontal de pocillos próxima a la región que se orientaría hacia el cátodo, conscientes de que la mayor parte de las enzimas migrarían hacia el ánodo. La aplicación de las muestras sobre el gel se efectuaba mediante la impregnación de fragmentos de papel Whatman nº 3 con los sobrenadantes correspondientes. Una vez impregnados, los papeles fueron introducidos en dichos pocillos. En el último de ellos se incluyó un papel empapado en un colorante trazador, azul de bromofenol al 0,5 % en agua destilada, que migra más rápidamente que cualquiera de las proteínas.

Tabla 2. Tampones y condiciones electroforéticas utilizados para cada enzima.

Enzima	Tampón electrodos	Tampón gel	Condiciones electroforéticas
ACO	0,1 M Citrato trisódico/Fosfato monosódico (pH 6,4)	Dilución 1:20	75 mA const. t = 4 h
AK	0,22 M Tris/0,08M Ác. cítrico (pH 6,0)	0,008 M Tris/0,003 M Ác. cítrico (pH 6,4)	150 V const. t = 4 h
ME	0,1 M Citrato trisódico/Fosfato monosódico (pH 6,4)	Dilución 1:20	50 mA const. t = 5 h
FH	0,1 M Citrato trisódico/Fosfato monosódico (pH 6,4)	Dilución 1:20	75 mA const. t = 4 h
GPD	0,689 M Tris/0,155 M Ác. cítrico (pH 8,0)	Dilución 1:10	100 mA const. t = 6 h
GPI	0,689 M Tris/0,155 M Ác. cítrico (pH 8,0)	Dilución 1:25	40 mA const. t = 6 h
GDH	0,689 M Tris/0,155 M Ác. cítrico (pH 8,0)	Dilución 1:10	100 mA const. t = 6 h
GOT	0,135 M Tris/0,043 M Ác. cítrico (pH 8,8)	Dilución 1:15	150 V const. t = 4 h
HK	0,22 M Tris/0,08 M Ác. cítrico (pH 6,3)	0,008 M Tris/0,003 M Ác. cítrico (pH 6,7)	150 V const. t = 4 h
IDH	0,135 M Tris/0,043 M Ác. cítrico (pH 8,8)	Dilución 1:15	150 V const. t = 4 h
MDH	10 ml N-(3-aminopropil) morfolina/0,04 M Ác. cítrico (pH 7,0-7,1)	Dilución 1:20	180 V const. t = 6 h
PGM	10 ml N-(3-aminopropil) morfolina/0,04 M Ác. cítrico (pH 7,0-7,1)	Dilución 1:20	180 V const. t = 6 h
PGD	0,22 M Tris/0,08 M Ác. cítrico (pH 6,3)	0,008 M Tris/0,003 M Ác. cítrico (pH 6,7)	180 V const. t = 3 h

Una vez cargado el gel y colocado en la cubeta de electroforesis en una cámara a 4 °C, se establecía el contacto eléctrico entre el tampón de los electrodos y el gel de almidón mediante un par de esponjas finas, dispuestas en los bordes anódico y catódico de la cubeta. Los electrodos se conectaban a una fuente de alimentación donde eran fijadas las condiciones específicas de voltaje e intensidad. Antes de proceder al revelado enzimático, el gel era trasladado a un soporte para ser cortado longitudinalmente mediante una cuerda de metal rígida, de tal manera que de cada gel se obtenían dos lonchas para ser reveladas de forma independiente. Por consiguiente, cuando las condiciones de migración lo permitieron, se pudieron analizar simultáneamente dos enzimas de cada individuo.

En cuanto al revelado enzimático, se realizaron ligeras modificaciones de los protocolos de tinción específica propuestos por Harris y Hopkinson (1976), Richardson *et al.* (1986), Pasteur *et al.* (1987) y Manchenko (1994). Las mezclas de reacción para cada revelado enzimático se especifican en la Tabla 3.

Tabla 3. Mezclas de reacción utilizadas en los revelados enzimáticos específicos.

Enzima	Tampón de revelado	Sustrato y enzimas de acoplamiento	Otros componentes
ACO	0,4 M Tris/HCl (pH 8,0) (12 ml)	Ác. cis-aconítico (0,1g) IDH (20 UI)	NADP (0,05 g) 0,5 M MgCl ₂ (7 ml) PMS 1 % (0,5 ml) MTT 1 % (1ml)
AK	0,2 M Tris/HCl (pH 8,0) (10 ml)	Glucosa (0,5 mg) HK (42 UI) GPD (38 UI)	0,5 M MgCl ₂ (5 ml) ADP (0,03 g) NADP 1 % (2,5 ml) PMS 1 % (0,5 ml)
FH	0,5 M Tris/HCl (pH 8,0) (15 ml)	Fumarato sódico (0,15 g) MDH (250 UI)	Piruvato sódico (0,04 g) NAD (0,04 g) PMS 1 % (0,5 ml) MTT 1 % (1 ml)
GDH	0,5 M Tris/HCl (pH 7,6) (15 ml)	Glutamato sódico (1,3 g)	NADP 1 % (1 ml) PMS 1 % (0,5 ml) MTT 1 % (1 ml)
GOT	0,5 M Na ₂ HPO ₄ /HCl (pH 7,5) (40 ml)	Ác. aspártico (0,4g)	Ác. α-cetoglutarico (0,15g) Piridoxal-5-fosfato (0,01g) *Fast Blue (0,4 g)

Tabla 3. Continuación.

Enzima	Tampón de revelado	Sustrato y enzimas de acoplamiento	Otros componentes
GPD	0,05 M Tris/HCl (pH 8,0) (10 ml)	Glucosa-6-fosfato (0,1 g)	0,5 M MgCl ₂ (5 ml) NADP 1 % (1 ml) PMS 1 % (0,5 ml) MTT 1 % (1 ml)
GPI	0,05 M Tris/HCl (pH 8,0) (15 ml)	Fructosa-6-fosfato (25 mg) GPD (5 UI)	NADP 1 % (1 ml) PMS 1 % (0,5 ml) MTT 1 % (1 ml)
HK	0,1 M Tris/HCl (pH 7,5) (18 ml)	Glucosa (0,08 g) GPD (30 UI)	ATP (0,05 g) 0,5 M MgCl ₂ (0,015 g) NADP (0,025 g) PMS 1 % (0,5 ml) MTT 1 % (1 ml)
IDH	0,05 M Tris/HCl (pH 8,0) (15 ml)	Ác. isocítrico (0,1 g)	0,5 M MgCl ₂ (0,5 ml) NADP 1 % (1 ml) PMS 1 % (0,5 ml) MTT 1 % (1 ml)
MDH	0,05 M Tris/HCl (pH 8,0) (10 ml)	1 M Ác. málico (pH 7,0)(5 ml)	0,5 M MgCl ₂ (1 ml) NAD 1 % (2 ml) PMS 1 % (0,5 ml) MTT 1 % (1 ml)
ME	0,1 M Tris/HCl (pH 8,0) (15 ml)	Ác. málico (0,1 g) (ajustar a pH 7,0 con NaOH)	0,5 M MgCl ₂ (2 ml) NADP 1 % (1 ml) PMS 1 % (0,5 ml) MTT 1 % (1 ml)
PGD	0,05 M Tris/HCl (pH 8,0) (10 ml)	Ác. 6-fosfogluconico (0,03g)	0,5 M MgCl ₂ (5 ml) NADP 1 % (0,5 ml) PMS 1 % (0,5 ml) MTT 1 % (1 ml)
PGM	0,05 M Tris/HCl (pH 8,0) (15 ml)	Glucosa-1-fosfato (0,1 g) GPD (20 UI)	0,5 M MgCl ₂ (2 ml) NADP 1 % (1,5 ml) PMS 1 % (0,5 ml) MTT 1 % (1 ml)

(*): Después de una hora de incubación del gel con el resto de la mezcla de revelado, se añade el Fast Blue disuelto en 25 ml de tampón de revelado y se incuba de nuevo en oscuridad hasta la aparición de los electromorfos (5-10 minutos).

El revelado para todos los sistemas enzimáticos, excepto para la enzima GOT, pues en este caso la disolución de revelado estuvo en permanente agitación durante su incubación, implicó la utilización de una solución de agarosa al 2 %. La incubación se realizó a temperatura ambiente y en oscuridad, salvo en los casos de las enzimas ACO y HK que requirieron una temperatura de 37 °C, hasta la aparición de los correspondientes electromorfos. La actividad enzimática se detuvo con una mezcla de fijación elaborada a base de ácido acético y agua destilada (2:8), que además permitía la conservación de los geles durante varios días.

Para descartar la posibilidad de contaminación enzimática procedente del tejido del hospedador, se realizaron controles para cada sistema enzimático con muestras de tejido hepático homogeneizado de vacas y ovejas. Estos extractos fueron obtenidos en las mismas condiciones que los de los parásitos y almacenados a -80 °C hasta ser sometidos a electroforesis. En todos los controles se detectó una actividad enzimática notable, pero hubo siempre una gran diferencia entre las movilidades relativas de las alozimas del parásito y las de los hospedadores, por lo que siempre resultaron de utilidad.

La interpretación genética de los zimogramas se realizó siguiendo las recomendaciones de May (1992), que tienen en cuenta el número de bandas y la intensidad de tinción, así como la estructura cuaternaria conocida para estas enzimas, información disponible de estudios análogos realizados en otros helmintos parásitos (Vilas *et al.*, 2002b). Para la denominación de las alozimas se adoptó el siguiente criterio: se nombró como 101 el alelo más próximo al origen y los demás fueron denominados consecutivamente según su posición hacia el frente de electroforesis. Los genotipos se obtuvieron a partir de los fenotipos electroforéticos por observación directa de los geles. La estructura cuaternaria de algunas de las enzimas pudo ser deducida a partir del número de bandas que mostró el individuo presuntamente heterocigoto, teniendo en cuenta el carácter diploide de los organismos considerados.

MARCADORES MICROSATÉLITES

EXTRACCIÓN DEL ADN

La obtención del ADN genómico se realizó según el método clásico de extracción con fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (Sambrook *et al.*, 1989). Las muestras de tejido se troceaban para facilitar la digestión enzimática y se introducían en tubos estériles de 2 ml, convenientemente rotulados, a los que se añadían: 45 µl de SDS al 10 %, 450 µl del tampón de extracción utilizado por Blanquer (1990) y 2,25 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Este tampón está compuesto por: NaCl 0,30 mM; Tris base 0,05 mM; EDTA 0,20 mM; EGTA 0,20 mM; espermidina 0,50 mM y espermina 0,10 mM. Para la digestión de los tejidos, los tubos eran incubados en un horno de hibridación durante toda la noche a 56 °C, en rotación suave y constante. Al día siguiente, se añadía 1 µl de ARNasa libre de ADNasa (10 mg/ml) y se incubaba a 37 °C durante una hora. Posteriormente, se añadían a cada tubo 500 µl de fenol equilibrado con Tris-HCl 0,5 M (pH 8,0). Tras incubar la mezcla durante unos minutos a temperatura ambiente, se centrifugaba durante 10 minutos a 13 000 rpm. Inmediatamente, se transfería la fase acuosa a tubos de 2 ml y se añadían 500 µl de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1). La mezcla era incubada a temperatura ambiente unos minutos y centrifugada de nuevo a 13 000 rpm durante 10 minutos, transfiriendo el sobrenadante final a tubos de 2 ml.

Para la precipitación del ADN, cada sobrenadante era mezclado con 1 000 µl de etanol absoluto en frío y se centrifugaban los tubos durante 10 segundos a 13 000 rpm. Posteriormente, el alcohol era eliminado por decantación y los sedimentos lavados con etanol de 70° a 4 °C para eliminar los restos de sales, centrifugándose de nuevo 10 segundos a 13 000 rpm. El etanol era aspirado y los tubos se dejaban destapados a temperatura ambiente hasta asegurar una completa evaporación de los restos de etanol. El sedimento obtenido se resuspendía en 50-200 µl de tampón TE 1X pH 8,0. El resultado de las extracciones era verificado midiendo las concentraciones de ADN en un espectrofotómetro. A continuación, se procedía a la preparación de alícuotas mediante la dilución de una pequeña parte de cada una de las muestras en agua mili-Q, a una concentración de aproximadamente 35 ng/µl, en las que se medía

nuevamente la concentración de ADN. Todas las alícuotas fueron almacenadas a 4 °C. Este procedimiento, aunque laborioso, proporcionó un ADN limpio, de buena calidad y perdurable.

AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR

Los seis marcadores microsatélites caracterizados hasta el momento en *F. hepatica* (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2004) fueron ensayados con algunos individuos de ciertas poblaciones del área de estudio. Este ensayo preliminar reveló el carácter monomórfico de uno de los marcadores, así como la interpretación confusa en términos genotípicos de otro locus, lo que derivó en la selección de los cuatro restantes (*FH15*, *FH23*, *FH25* y *FH222CBP*) para llevar a cabo la investigación en las poblaciones de estudio. Estos loci fueron amplificados mediante PCR (Saiki *et al.*, 1985), utilizando los cebadores previamente publicados, y genotipados mediante un análisis del tamaño de los fragmentos. La amplificación de cada locus microsatélite se realizó siguiendo el protocolo descrito por Hurtrez-Boussès *et al.* (2004), ligeramente modificado (Tabla 4). De modo general, se optimizó el volumen final de reacción a 15 µl para cada muestra analizada. El tampón de amplificación utilizado fue GeneAmp® 10X PCR Gold Buffer (Applied Biosystems) a una concentración del 10 %. Cada uno de los cuatro dNTPs se añadió en cantidades equimolares a una concentración final de 100 µM. Los cebadores, tanto el directo como el reverso, se agregaron a una concentración de 10 pmol. Con objeto de poder detectar los fragmentos amplificados en el secuenciador automático, el extremo 5' de los cebadores directos fue marcado con un compuesto fluorescente sensible al haz del láser de los detectores del secuenciador, distinto según el locus a analizar. Las concentraciones de MgCl₂ utilizadas fueron ajustadas previamente para optimizar las PCRs de los distintos loci, ya que la ADN polimerasa es muy sensible a pequeñas variaciones en la concentración de Mg²⁺. Por cada mezcla de reacción se empleó 1 µl de ADN extraído y 0,5 unidades de *Taq* ADN polimerasa (AmpliAq Gold® DNA Polymerase; Applied Biosystems), completándose el volumen final requerido con agua mili-Q. Asimismo, se realizaron controles con el ADN de los hospedadores para descartar posibles contaminaciones, resultando negativos en todos los casos.

Tabla 4. Condiciones de amplificación y características de los loci microsatélites utilizados en el presente estudio.

Locus	Unidad de repetición	Secuencias de los cebadores (5'→3')	T _a (°C)	MgCl ₂ (mM)	Fluoróforo
<i>FH15</i>	(GT) ₅ AC(GTAT) ₂ GCA (GTAT) ₂ (GT) ₂ CT(GT) ₉	F:TTCTTCAAGCCGAATTGC R:AATTGTTGTGCTGAAACTGG	48	1,5	6-FAM
<i>FH23</i>	(GTTT) ₄ (GT) ₈ CT(GT) ₆ CT (GT) ₇ (GGT) ₄ (GT) ₆ AA(GT) ₃	F:AGCACCAAGGAAAAATTGAG R:GCGAATTAAATACAGCAAACC	48	1,5	PET
<i>FH25</i>	(AC) ₈	F:TAGCGGTTTTGACTCTAC R:GATTCGGTTAGGATGTTG	51	1,5	VIC
<i>FH222CBP</i>	(CA) ₁₇	F:GTGGATCCCCCACTGTGAGAC R:TGTCCAACTGCATGAACCAT	50	1,2	NED

F: cebador directo; R: cebador inverso; T_a: temperatura de anillamiento.

El programa de amplificación se llevó a cabo en un termociclador automático PTC-100 (MJ RESEARCH), utilizando tubos de paredes ultrafinas de 200 μ l, según el siguiente protocolo: desnaturalización inicial del ADN a 94 °C durante cuatro minutos, 30 ciclos de amplificación (94 °C durante 30 segundos; temperatura de anillamiento correspondiente durante 30 segundos; 72 °C durante 30 segundos) y una extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Una vez finalizada la reacción de PCR, se evaluó el éxito del proceso de amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % (p/v) en tampón TBE 0,5X, teñidos con bromuro de etidio. En el primer pocillo de cada gel se cargó una mezcla de 7,5 μ l de agua mili-Q; 0,5 μ l del marcador de tamaño molecular (100 Base-Pair Ladder; GE Healthcare) y 1 μ l del marcador del frente de electroforesis. Los restantes pocillos fueron cargados con 7 μ l del correspondiente producto de amplificación y 1 μ l del marcador del frente de electroforesis. Una vez conectados los electrodos a la fuente de alimentación, se aplicó en la cubeta de electroforesis una corriente constante de 135 V durante aproximadamente 20 minutos. Finalizada la electroforesis, se visualizaron las bandas de ADN mediante un transiluminador de luz ultravioleta. Con el fin de valorar la amplificación conseguida en la reacción de PCR, se fotografiaron los geles con una cámara Polaroid.

GENOTIPADO DE LOS LOCI MICROSATÉLITES

La determinación precisa del tamaño de los fragmentos de ADN microsatélite amplificados se realizó mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI PRISM 3730xl[®] (Applied Biosystems). El equipo consta de un conjunto de 16 capilares que operan en paralelo y de un sistema de detección por láser de cinco fluoróforos. Así, en un mismo capilar, se pueden analizar varios loci microsatélites con rangos de tamaño solapante, al poder emplear fluoróforos diferentes para cada uno de ellos. Al mismo tiempo, es posible marcar con el mismo fluoróforo aquellos loci que no se solapan. Este sistema permitió analizar simultáneamente en un solo capilar los cuatro loci microsatélites pertenecientes a cada individuo. Para llevar a cabo el genotipado en el secuenciador, se utilizaron placas de 96 pocillos. En cada pocillo se cargó una

mezcla de 19,75 µl de formamida (Applied Biosystems); 0,25 µl del marcador de tamaño (GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard; Applied Biosystems) y 0,5 µl del producto de amplificación, adecuadamente diluido para evitar problemas de saturación de la señal. Las muestras se inyectaron automáticamente en los capilares previamente cargados con un polímero específico (POP-4) que actúa como matriz de separación. El genotipado se realizó con el software GeneMapper® 4.0. Los fragmentos de distinto tamaño fueron expresados como picos de absorbancia en un cromatograma, de manera que los individuos homocigotos y heterocigotos se caracterizaron por revelar uno y dos picos, respectivamente. Los alelos se identificaron según el tamaño de los fragmentos en pares de bases, lo que permitió la inferencia del genotipo en cada locus microsatélite. En aquellos casos en los que el genotipado resultó dudoso, se repitió alguno de los pasos anteriores hasta obtener un resultado fiable o fue considerado “missing data”.

ANÁLISIS DE DATOS

IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS CLONALES

La variación detectada en los 12 marcadores genéticos codominantes estudiados, ocho alozimas y cuatro microsatélites, permitió la obtención de genotipos para múltiples loci (MLGs) correspondientes a cada individuo. Los MLGs idénticos fueron identificados con GENCLONE 2.0 (Arnaud-Haond y Belkhir, 2007). Este programa también se utilizó para calcular la probabilidad de que los grupos de MLGs idénticos correspondan a individuos clonales, es decir, individuos resultantes de mecanismos de amplificación asexual y, por consiguiente, genéticamente idénticos para todos sus loci. El análisis estadístico dirigido a la identificación de clones se llevó a cabo utilizando las frecuencias alélicas estimadas en cada población geográfica. Dada la posibilidad de que dos MLGs idénticos puedan ser producto de reproducción sexual, probabilidad evidentemente mayor cuanto menor sea la variabilidad genética de la población, se calcularon los valores de p_{sex} para cada MLG repetido, es decir, la probabilidad de observar n copias de un MLG en una muestra determinada bajo la hipótesis de panmixia. De esta manera, si un grupo con idéntico MLG presenta un valor de p_{sex} estadísticamente significativo para $n = 2$ ($p_{\text{sex}} < 0,05$), todos los individuos con ese

mismo MLG pueden ser considerados resultado de amplificación clonal. Sin embargo, cuando este valor es estadísticamente significativo para $n > 2$, es poco probable que existan más de $n - 1$ clones con ese mismo MLG (Gregorius, 2005). Así, si un determinado MLG presenta cuatro copias y su valor de p_{sex} es estadísticamente significativo para $n = 3$, pero no para $n = 2$, podemos concluir que al menos tres de los cuatro individuos genéticamente idénticos son clones. El cálculo de los valores p_{sex} se realizó para cada población geográfica, es decir, los parásitos de cada una de las 11 granjas representaron un conjunto de datos independientes que se utilizaron como archivo de entrada en GENCLONE, a fin de evitar la sobreestimación del número de clones debida a diferencias en las frecuencias alélicas entre poblaciones. En este cálculo se tuvo en cuenta la posible desviación del HWE. La diversidad genotípica (G) se calculó como el número de MLGs observado dividido por el número total de individuos muestreados.

En el caso de las ovejas, donde la presencia de clones fue frecuente, se testó si los MLGs repetidos estadísticamente significativos ($p_{\text{sex}} < 0,05$ para $n = 2$) se presentaron en los mismos hospedadores con mayor frecuencia que la esperada por azar, ya que ello puede considerarse una evidencia adicional de que tales grupos estarían compuestos por individuos resultantes de amplificación clonal. Para ello, se construyó una tabla de contingencia de cada supuesto clon por infrapoblación mediante el programa RxC (Miller, 1997), que emplea el algoritmo de Metrópolis para obtener estimas no sesgadas de los valores de P , según el test de Fisher. Los resultados de la tabla se confrontaron con la hipótesis nula de la falta de asociación entre los miembros de un supuesto clon y las infrapoblaciones en las que se recolectó cada miembro. La asociación significativa sugeriría la transmisión agregada de los grupos de individuos con el mismo MLG, lo cual, en virtud del ciclo vital del parásito, corroboraría la hipótesis de que tales grupos son verdaderos clones.

Una vez identificados los clones, el análisis de estructura genética poblacional se llevó a cabo con y sin clones, con el fin de evaluar el efecto que la reproducción asexual tiene sobre la misma. En los análisis sin clones, todos los grupos con el mismo MLG se redujeron a una sola copia en el conjunto de los datos. Los MLGs incompletos fueron excluidos a la hora de identificar los

especímenes verdaderamente clonales, aunque se incluyeron en el análisis de estructura genética poblacional con objeto de aumentar el tamaño de muestra.

EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG Y ESTIMACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

La estimación de frecuencias alélicas y genotípicas en cada población se realizó con la ayuda del programa GENEPOP 4.0.10 (Raymond y Rousset, 1995; Rousset, 2008). Este programa se utilizó además en la comparación de las estimaciones obtenidas con los valores esperados según un modelo teórico que asume panmixia, el HWE. La magnitud de la desviación entre los valores observados y esperados en el HWE fue cuantificada mediante el estadístico F de Wright (1965), que en un contexto de estructuración equivale al estadístico F_{IS} . Si la única causa de la desviación del equilibrio es la existencia de apareamientos consanguíneos, el estadístico F coincide con el índice de consanguinidad. Este estadístico cuantifica la desviación dentro de una población y se relaciona con la heterocigosis de la siguiente manera:

$$F_{IS} = \frac{H_e - H_o}{H_e} = 1 - \frac{H_o}{H_e}$$

donde H_o y H_e son las proporciones de heterocigotos observadas y esperadas en el HWE, respectivamente. Luego, F_{IS} puede variar entre menos uno y uno. F_{IS} es igual a cero cuando no existe desviación, es decir, cuando el número de heterocigotos observado coincide con el esperado; vale menos uno cuando la muestra contiene el máximo exceso de heterocigotos y vale uno cuando exhibe el máximo defecto de heterocigotos. Por ejemplo, en un locus con dos alelos, la máxima heterocigosis esperada en el HWE es del 50 %; si en estas condiciones la muestra estuviese integrada únicamente por heterocigotos, de manera que la heterocigosis observada fuese igual a uno, F_{IS} valdría menos uno. Por el contrario, si la muestra revelase una heterocigosis igual a cero, F_{IS} valdría uno. En general, valores negativos indican un exceso de heterocigotos con respecto a lo esperado bajo panmixia, mientras que valores positivos indican un déficit.

En particular, las desviaciones del HWE detectadas en este estudio fueron cuantificadas mediante el estimador de Weir y Cockerham (1984) del estadístico F de Wright y su significación estadística fue examinada mediante el test de Fisher con la ayuda de GENEPOP 4.0.10 (Raymond y Rousset, 1995; Rousset, 2008). Este programa también se utilizó en la estimación de posibles asociaciones no aleatorias entre pares de loci. Cuando se realizó el mismo test múltiples veces, el nivel de significación se ajustó de acuerdo con el método de Bonferroni (Rice, 1989).

Los niveles de variabilidad genética fueron estimados mediante el número medio de alelos por locus (A), el porcentaje de loci polimórficos según los criterios del 95 % (P_{95}) y del 99 % (P_{99}), la heterocigosis observada (H_o) y la heterocigosis esperada (H_e). Concretamente, en este último caso se utilizó un estimador no sesgado (Nei, 1987). Estos parámetros fueron calculados con el programa GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996-2004). Además, se calculó la riqueza alélica (AR) mediante el programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995), lo que representa una corrección que se aplica al número observado de alelos de acuerdo con el tamaño de muestra, facilitando así cualquier análisis comparativo.

ANÁLISIS DE ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

La estructura genética de una población subdividida puede analizarse por medio de los estadísticos F de Wright (1965). Así, la desviación dentro de cada subpoblación, presumiblemente debida al apareamiento no aleatorio, se cuantifica mediante el estadístico F_{IS} . Sin embargo, puede haber panmixia en cada subpoblación y aún así la población en su conjunto desviarse de los valores esperados en el HWE, debido a la existencia de diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre las subpoblaciones, un fenómeno denominado efecto Wahlund. La cuantificación de estas diferencias en una población subdividida viene dada por el estadístico F_{ST} y, en este sentido, proporciona una estimación del grado de desviación atribuible a diferencias genéticas entre subpoblaciones. Finalmente, el estadístico F_{IT} supone una medida global de desviación, que no discrimina entre la desviación que tiene lugar dentro de cada subpoblación y la causada por el efecto Wahlund. En un contexto de subdivisión poblacional, los tres

estadísticos pueden ser calculados para un locus a partir de las heterocigosis observadas y esperadas. Los tres estadísticos pueden ser calculados como:

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S}; \quad F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}; \quad F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T}$$

donde H_I y H_S son la media de las heterocigosis observadas y de las heterocigosis esperadas en el conjunto de las subpoblaciones, respectivamente; H_T es la heterocigosis esperada cuando el conjunto de la población es considerada una sola unidad panmíctica, es decir, cuando se asume que no está subdividida, lo que implica calcular la heterocigosis esperada a partir de la media de las frecuencias alélicas entre las subpoblaciones.

El estadístico F_{ST} varía entre cero y uno, proporcionando cierta información de divergencia genética. Por ejemplo, en el caso de un locus con dos alelos, el estadístico vale cero cuando todas las subpoblaciones tienen las mismas frecuencias alélicas y uno cuando las subpoblaciones están fijadas para alelos distintos. Al igual que F_{IS} , F_{IT} puede tomar cualquier valor entre menos uno y uno. Evidentemente, los tres estadísticos valen cero cuando no existe desviación con respecto a los valores esperados en el HWE. La relación entre ellos no es aditiva, sino que:

$$F_{IT} = F_{IS} + F_{ST} - F_{IS} \times F_{ST}$$

o, lo que es lo mismo:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$$

Generalmente, los valores de los estadísticos F correspondientes a una muestra de loci se calculan como una media ponderada sobre todos los loci. Este cálculo se realizó mediante el programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995). La significación estadística de F_{IS} y F_{IT} fue determinada mediante 10 000 randomizaciones de alelos entre individuos dentro de las infrapoblaciones (cada infrapoblación fue considerada una subpoblación) y en la población en su conjunto,

respectivamente; mientras que la de F_{ST} supuso 10 000 randomizaciones de genotipos entre infrapoblaciones. Al objeto de permitir una comparación entre los valores de F_{ST} derivados del análisis de muestras que difieren en heterocigosis, se calcularon valores estandarizados de F_{ST} según el método de Meirmans (2006). Además, se calcularon los valores de F_{ST} entre pares de infrapoblaciones, lo que permitió su comparación directa con medidas de divergencia genética interpoblacional, tal como la distancia genética de Nei (D_a ; Nei, 1987).

Además del cálculo de estadísticos F , se realizaron dos análisis complementarios de estructura genética poblacional. Por un lado, se llevó a cabo un análisis factorial de correspondencias (FCA) con la ayuda del programa GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996-2004). En genética de poblaciones, este análisis multivariante se utiliza para reducir el número de variables asignadas a cada población, de tal manera que con la menor pérdida de información posible puedan ajustarse los resultados a dos o tres dimensiones, logrando así representaciones gráficas que determinen las relaciones genéticas en el espacio de las poblaciones estudiadas (Renaud, 1988; Coustau *et al.*, 1991). Asimismo, esta técnica puede resultar útil en la detección de estructura poblacional críptica (Solano *et al.*, 2000), pues permite además un análisis de la variación a nivel individual. Por otro lado, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) mediante el programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). El AMOVA permite agrupar las poblaciones en diferentes modelos jerárquicos, siempre que estructuren la variabilidad en tres niveles: dentro de las poblaciones (F_{ST}), entre poblaciones dentro de un mismo grupo (F_{SC}) y entre grupos (F_{CT}). En el presente estudio, se realizaron dos agrupaciones siguiendo diferentes criterios. En primer lugar, se comparó el conjunto de las infrapoblaciones de vacas con el de las ovejas para determinar la existencia de diferencias genéticas atribuibles a la especie hospedadora. En segundo lugar, las infrapoblaciones ovinas se agruparon en función de la fecha de muestreo (2006 y 2008), al objeto de conocer qué parte de la variación puede ser atribuida a diferencias temporales en las frecuencias alélicas. El análisis proporcionó en cada caso el porcentaje de la variabilidad explicado por cada nivel jerárquico, así como su nivel de significación estadística, la cual fue calculada mediante procesos de permutación no paramétricos: de genotipos entre poblaciones y entre grupos, de individuos entre poblaciones dentro de cada grupo y

de poblaciones entre los grupos. En todos los análisis se realizaron un total de 10 000 permutaciones al azar.

Los tres análisis de estructura poblacional se complementaron con la estimación de distancias genéticas absolutas entre infrapoblaciones. En particular, se construyó una matriz de distancias genéticas D_a mediante el programa POPULATIONS 1.2.31 (Langella, 2002), calculándose D_a como sigue:

$$D_a = 1 - \frac{1}{l} \sum_j^l \sum_i^{m_j} (x_{ij} y_{ij})^{1/2}$$

donde l es el número de loci analizados, x_{ij} e y_{ij} son las frecuencias del alelo i -ésimo en el locus j -ésimo en las poblaciones x e y . Esta medida toma un valor entre cero y uno, obteniéndose el máximo cuando las dos poblaciones no comparten ningún alelo.

Para visualizar las relaciones genéticas entre las poblaciones analizadas, se construyó un árbol filogenético sin raíz a partir de la matriz de distancias entre pares de infrapoblaciones, mediante el algoritmo Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) utilizando el programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

RESULTADOS

VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAPOBLACIONAL

Con el fin de obtener marcadores alozímicos polimórficos que resultasen útiles en la caracterización de la estructura genética poblacional de *F. hepatica*, se analizó una muestra de 16 loci en tres poblaciones diferentes de ganado bovino, cada una de ellas representada por una única infrapoblación (VAL, COR y NOG). En general, los genotipos pudieron ser fácilmente inferidos a partir de los fenotipos electroforéticos que, cuando fueron el producto de un genotipo presuntamente heterocigoto, permitieron deducir la estructura cuaternaria de la enzima. Así, para las enzimas ACO, AK, GOT, HK y PGM, todos los individuos presuntamente heterocigotos manifestaron un fenotipo electroforético de dos bandas, indicando que las formas enzimáticas activas tienen una estructura cuaternaria monomérica. En el caso de GPI, IDH, MDH y PGD, los individuos heterocigotos se caracterizaron por un perfil electroforético de triple banda, lo que sugiere una estructura dimérica para estas enzimas. Además, se pudo comprobar que los individuos heterocigotos para FH mostraron un fenotipo electroforético de cinco bandas, típico de enzimas tetraméricas. Todas las estructuras cuaternarias inferidas concuerdan con los resultados obtenidos en estudios análogos de otros organismos (Manchenko, 1988; May, 1992; Ward *et al.*, 1992), especialmente helmintos parásitos (Vilas *et al.*, 2002b).

Las tres infrapoblaciones de *F. hepatica* estudiadas presentaron niveles sustanciales de variación alozímica, variando la proporción de loci polimórficos, según el criterio del 95 %, entre el 31,2 % y el 43,7 % (Tabla 5).

Tabla 5. Índices de variabilidad genética estimados en el análisis alozímico preliminar de *Fasciola hepatica*.

	A	P ₉₅	P ₉₉	H _o	H _e
VAL	1,625	0,437	0,500	0,116	0,158
COR	1,687	0,375	0,625	0,139	0,168
NOG	1,687	0,312	0,625	0,127	0,146

A: número medio de alelos; P₉₅: porcentaje de loci polimórficos según el criterio del 95 %; P₉₉: porcentaje de loci polimórficos según el criterio del 99 %; H_o: heterocigosis observada; H_e: heterocigosis esperada.

De los 16 loci analizados, siete mostraron variación en las tres infrapoblaciones estudiadas, 10 en al menos dos infrapoblaciones y 11 en al menos una. Los loci *Ak*, *Got-1*, *Idh*, *Pgd* y *Pgm-2* fueron polimórficos, según el criterio del 95 %, en las tres infrapoblaciones, mientras que los loci *Hk* y *Aco* solo lo fueron en dos y en una, respectivamente (Figura 4).

El número de individuos analizados por locus, las frecuencias alélicas y la magnitud de la desviación del HWE cuantificada mediante el estimador de Weir y Cockerham del estadístico F_{IS} de Wright, así como las heterocigosis estimadas en cada infrapoblación, se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Tamaño de muestra (N), frecuencias alélicas, heterocigosis observada (H_o) y esperada (H_e), y desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (F_{IS}) en tres infrapoblaciones de *Fasciola hepatica*.

	VAL	COR	NOG		VAL	COR	NOG
Aco				Hk			
N	48	30	31	N	42	23	27
101	0,906	0,967	0,984	101	0,857	0,826	1,000
102	0,083	0,033	0,016	102	0,143	0,174	0,000
103	0,010	0,000	0,000	H_o	0,143	0,261	0,000
H_o	0,187	0,067	0,032	H_e	0,248	0,294	0,000
H_e	0,173	0,065	0,032	F_{IS}	0,427	0,114	--
F_{IS}	-0,082	-0,017	0,000				
Ak				Idh			
N	48	30	32	N	48	30	32
101	0,469	0,483	0,375	101	0,073	0,167	0,109
102	0,531	0,517	0,625	102	0,927	0,833	0,891
H_o	0,229	0,167	0,312	H_o	0,146	0,333	0,219
H_e	0,503	0,508	0,476	H_e	0,137	0,282	0,198
F_{IS}	0,547*	0,676*	0,347	F_{IS}	-0,068	-0,184	-0,107
Fh				Mdh-1			
N	48	30	31	N	48	30	31
101	0,958	0,967	0,984	101	1,000	1,000	0,952
102	0,042	0,033	0,016	102	0,000	0,000	0,048
H_o	0,083	0,067	0,032	H_o	0,000	0,000	0,097
H_e	0,081	0,065	0,032	H_e	0,000	0,000	0,094
F_{IS}	-0,033	-0,017	0,000	F_{IS}	--	--	-0,034

Tabla 6. Continuación.

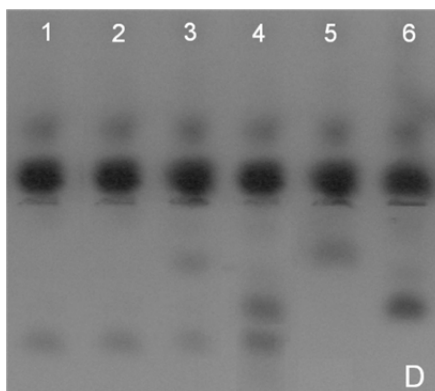
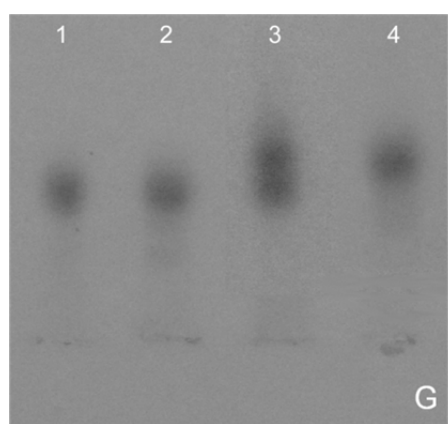
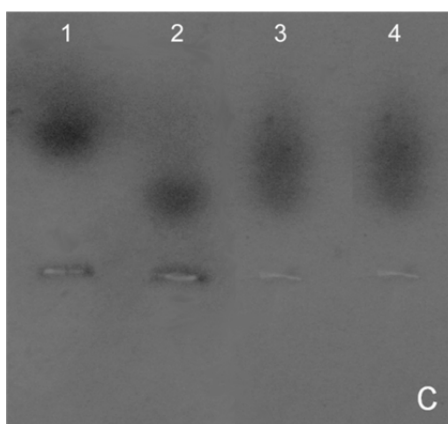
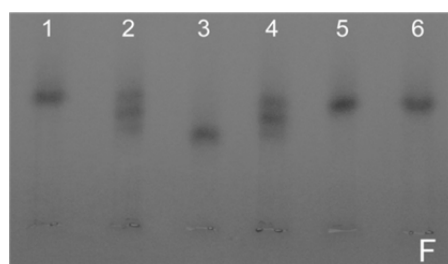
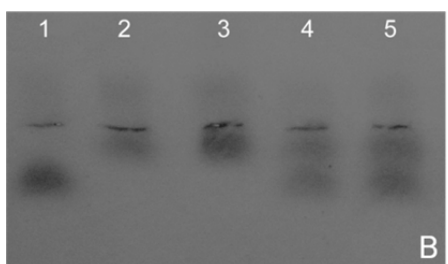
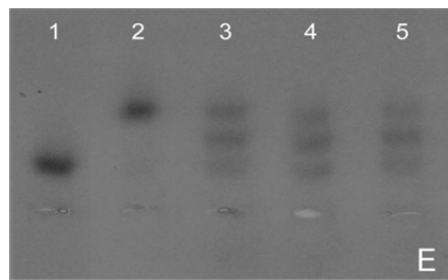
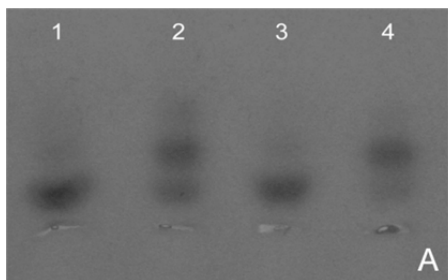
	VAL	COR	NOG		VAL	COR	NOG
Gdh				Mdh-2			
N	48	30	32	N	48	30	31
101	1,000	1,000	1,000	101	1,000	1,000	1,000
H _o	0,000	0,000	0,000	H _o	0,000	0,000	0,000
H _e	0,000	0,000	0,000	H _e	0,000	0,000	0,000
F _{IS}	--	--	--	F _{IS}	--	--	--
Got-1				Me			
N	48	30	32	N	48	30	32
101	0,198	0,183	0,250	101	1,000	1,000	1,000
102	0,802	0,817	0,750	H _o	0,000	0,000	0,000
H _o	0,271	0,233	0,375	H _e	0,000	0,000	0,000
H _e	0,321	0,304	0,381	F _{IS}	--	--	--
F _{IS}	0,157	0,237	0,016				
Got-2				Pgd			
N	48	30	32	N	48	30	32
101	1,000	1,000	1,000	101	0,448	0,550	0,563
H _o	0,000	0,000	0,000	102	0,552	0,450	0,437
H _e	0,000	0,000	0,000	H _o	0,396	0,567	0,562
F _{IS}	--	--	--	H _e	0,500	0,503	0,500
				F _{IS}	0,210	-0,128	-0,127
Gpd				Pgm-1			
N	48	30	32	N	48	30	32
101	1,000	1,000	1,000	101	1,000	0,983	0,984
H _o	0,000	0,000	0,000	102	0,000	0,017	0,016
H _e	0,000	0,000	0,000	H _o	0,000	0,033	0,031
F _{IS}	--	--	--	H _e	0,000	0,033	0,031
				F _{IS}	--	0,000	0,000
Gpi				Pgm-2			
N	48	30	32	N	48	30	32
101	1,000	0,967	0,984	101	0,531	0,483	0,609
102	0,000	0,033	0,016	102	0,073	0,067	0,141
H _o	0,000	0,067	0,031	103	0,396	0,450	0,250
H _e	0,000	0,065	0,031	H _o	0,396	0,433	0,344
F _{IS}	--	-0,017	0,000	H _e	0,562	0,569	0,555
				F _{IS}	0,297	0,241*	0,384

*P < 0,0045

Cabe destacar que la infrapoblación NOG se caracterizó por la presencia en exclusiva del alelo 102 en *Mdh-1* y por la ausencia del alelo 102 en el locus *Hk*. Asimismo, la infrapoblación VAL fue la única que presentó el alelo 103 en el locus *Aco* y que careció del alelo 102 en los loci *Gpi*, *Mdh-1* y *Pgm-1*. Además, excepto para el locus *Pgd* en la infrapoblación VAL, el alelo más común para cada locus en las tres infrapoblaciones fue siempre el mismo. La heterocigosis esperada en el HWE por locus varió entre 0 y 0,569. Únicamente los loci *Ak* y *Pgm-2* mostraron desviaciones estadísticamente significativas con respecto al HWE en alguna de las tres infrapoblaciones analizadas. Tales desviaciones siempre fueron en el sentido de un defecto de heterocigotos. Solo la infrapoblación COR reveló ambos loci en desequilibrio Hardy-Weinberg, mientras que la infrapoblación NOG no mostró desviaciones significativas para ningún locus. No se detectaron asociaciones genotípicas estadísticamente significativas entre pares de loci en ninguna de las tres infrapoblaciones.

Los siete loci alozímicos polimórficos según el estudio preliminar, además del *Pgm-1* y los cuatro microsatélites seleccionados, se analizaron posteriormente en otras 11 poblaciones geográficas, 10 muestreadas en ganado vacuno y una en ganado ovino. Cabe señalar que las 10 poblaciones bovinas estuvieron representadas por una sola infrapoblación, mientras que la población ovina estuvo compuesta por la mezcla de 10 infrapoblaciones.

Figura 4. Polimorfismo alozímico obtenido en *Fasciola hepatica*. **A.** Aconitasa: **1** y **3** (Aco^{101}/Aco^{101}); **2** (Aco^{101}/Aco^{102}); **4** (Aco^{102}/Aco^{102}). **B.** Adenilato quinasa: **1** (Ak^{102}/Ak^{102}); **2** y **3** (Ak^{101}/Ak^{101}); **4** y **5** (Ak^{101}/Ak^{102}). **C.** Glutamato oxalacetato transaminasa: **1** ($Got-1^{102}/Got-1^{102}$); **2** ($Got-1^{101}/Got-1^{101}$); **3** y **4** ($Got-1^{101}/Got-1^{102}$). **D.** Fosfoglucomutasa (*Pgm-1* bandas anódicas, *Pgm-2* bandas catódicas): **1** y **2** ($Pgm-1^{101}/Pgm-1^{101}$, $Pgm-2^{103}/Pgm-2^{103}$); **3** ($Pgm-1^{101}/Pgm-1^{101}$, $Pgm-2^{101}/Pgm-2^{103}$); **4** ($Pgm-1^{101}/Pgm-1^{101}$, $Pgm-2^{102}/Pgm-2^{103}$); **5** ($Pgm-1^{101}/Pgm-1^{101}$, $Pgm-2^{101}/Pgm-2^{101}$); **6** ($Pgm-1^{101}/Pgm-1^{101}$, $Pgm-2^{102}/Pgm-2^{102}$). **E.** Fosfogluconato deshidrogenasa: **1** (Pgd^{101}/Pgd^{101}); **2** (Pgd^{102}/Pgd^{102}); **3**, **4** y **5** (Pgd^{101}/Pgd^{102}). **F.** Isocitrato deshidrogenasa: **1**, **5** y **6** (Idh^{102}/Idh^{102}); **2** y **4** (Idh^{101}/Idh^{102}); **3** (Idh^{101}/Idh^{101}). **G.** Hexoquinasa: **1** y **2** (Hk^{101}/Hk^{101}); **3** (Hk^{101}/Hk^{102}); **4** (Hk^{102}/Hk^{102}).



Los datos referentes a la variabilidad de los microsatélites examinados se muestran en la Tabla 7. El número de alelos observado en el ganado bovino varió entre cinco para el locus *FH25* y 20 para el locus *FH222CBP*. En el caso de las ovejas, el número de alelos osciló entre cinco y nueve para los loci *FH23* y *FH222CBP*, respectivamente. Este último locus mostró los valores más elevados de heterocigosis esperada y observada, tanto en vacas como en ovejas. Asimismo, en ambos tipos de ganado, el locus *FH15* fue el menos variable en cuanto a los dos índices de heterocigosis, aunque presentó un número relativamente elevado de alelos. El número medio de alelos por locus fue 11,5 en el ganado bovino y 6,75 en el ganado ovino.

Tabla 7. Variabilidad genética y rango de tamaño para cuatro microsatélites de *Fasciola hepatica* analizados en ganado bovino y ovino.

Locus	Número de alelos		Intervalo alélico (pb)		H_o		H_e	
	Vacas	Ovejas	Vacas	Ovejas	Vacas	Ovejas	Vacas	Ovejas
<i>FH15</i>	11	7	228-260	228-240	0,147	0,068	0,322	0,148
<i>FH23</i>	10	5	275-321	275-299	0,315	0,206	0,654	0,661
<i>FH25</i>	5	6	276-284	276-288	0,377	0,436	0,415	0,530
<i>FH222CBP</i>	20	9	143-181	147-173	0,856	0,617	0,861	0,745
Media	11,5	6,75	--	--	0,424	0,332	0,563	0,521

H_o : heterocigosis observada; H_e : heterocigosis esperada.

Las frecuencias alélicas correspondientes a los dos tipos de marcadores se recogen en las Tablas 1 y 2 del Anexo. Además, se detalla el número de individuos analizados, la riqueza alélica y las heterocigosis obtenidas por locus en las 11 poblaciones geográficas de *F. hepatica* estudiadas, así como en las 10 infrapoblaciones ovinas.

Los niveles de variabilidad genética estimados en las poblaciones geográficas de *F. hepatica* estudiadas fueron relativamente elevados, independientemente del marcador empleado (Tabla 8). Los microsatélites presentaron índices de variabilidad

genética significativamente superiores a los detectados en los loci alozímicos (prueba U de Mann-Whitney de dos colas, $P < 0,001$). Además, cabe señalar que las poblaciones bovinas revelaron índices de variabilidad genética más elevados que la población ovina, aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas (prueba U de Mann-Whitney de dos colas, $P > 0,05$).

Tabla 8. Niveles de variabilidad genética estimados mediante marcadores alozímicos y microsatélites en 10 poblaciones geográficas de *Fasciola hepatica* en ganado bovino y una en ganado ovino (MBO).

	<i>N</i>	Loci alozímicos				Loci microsatélites			
		<i>A</i>	<i>AR</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>A</i>	<i>AR</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>
ABG	51	2,2	2,20	0,172	0,262	5,5	5,21	0,412	0,576
BOV2	46	2,4	2,31	0,252	0,375	7,0	6,33	0,439	0,540
CHAN	41	2,0	1,96	0,215	0,312	6,0	5,66	0,416	0,549
COL	34	2,1	2,12	0,245	0,357	5,7	5,55	0,436	0,532
MES	33	2,1	2,12	0,188	0,350	6,0	5,87	0,338	0,494
CER	50	2,1	2,12	0,230	0,343	6,5	6,10	0,371	0,582
MEL	37	2,1	2,10	0,241	0,325	5,5	5,13	0,446	0,526
CCD	49	2,1	2,07	0,238	0,355	6,0	5,39	0,457	0,572
GUN	54	2,1	2,07	0,232	0,339	7,2	6,46	0,434	0,536
BOV1	43	2,2	2,21	0,342	0,378	6,7	6,23	0,475	0,555
MBO	149	2,2	2,11	0,224	0,318	6,7	4,85	0,332	0,521

N: número de individuos analizados; *A*: número medio de alelos; *AR*: riqueza alélica; *H_o*: heterocigosis observada; *H_e*: heterocigosis esperada.

DIVERSIDAD GENOTÍPICA Y ESTRUCTURA CLONAL

De los 328 MLGs diferentes de *F. hepatica* observados en el ganado bovino, solo uno estuvo presente en dos poblaciones geográficas, en ambas representado por un ejemplar. Este resultado sugiere que la variabilidad de los marcadores genéticos

utilizados es suficiente para la detección de individuos genéticamente idénticos. El número de MLGs con más de una copia por infrapoblación fue relativamente bajo, variando entre cero y cinco (Tabla 9). En consecuencia, la diversidad genotípica en las infrapoblaciones bovinas, que representan diferentes poblaciones geográficas, fue relativamente alta, variando entre 0,652 en ABG y 1,000 en MEL, CCD y BOV1. No obstante, todos los grupos de parásitos con MLGs idénticos presentaron valores de P_{sex} estadísticamente significativos para $n = 2$ ($P_{\text{sex}} < 0,05$), de manera que todos los individuos con el mismo MLG pudieron ser considerados resultado de amplificación clonal. Las infrapoblaciones ABG y CHAN mostraron el mayor número de MLGs multicopia, albergando cinco y cuatro respectivamente. Sin embargo, solo dos MLGs presentaron más de tres copias en la infrapoblación ABG.

Tabla 9. Número de genotipos multilocus (MLGs) y MLGs repetidos de *Fasciola hepatica* en 10 poblaciones geográficas de ganado bovino.

	N	MLGs	MLGs > 1 copia	G
ABG	46	30	5	0,652
BOV2	41	40	1	0,976
CHAN	31	27	4	0,871
COL	23	22	1	0,956
MES	23	22	1	0,956
CER	44	42	2	0,954
MEL	34	34	0	1,000
CCD	32	32	0	1,000
GUN	48	47	1	0,979
BOV1	32	32	0	1,000

N: tamaño de muestra después de excluir los genotipos en los que faltan datos (MLGs incompletos); G: diversidad genotípica.

Las infrapoblaciones procedentes de ganado ovino mostraron 71 MLGs diferentes, de los cuales 20 fueron multicopia (Tabla 10). La diversidad genotípica de la única población geográfica estudiada de *F. hepatica* en ovinos fue más baja que la observada en poblaciones geográficas procedentes del ganado bovino, las cuales estuvieron representadas únicamente por una infrapoblación ($G = 0,577$).

Tabla 10. Distribución de MLGs (en cursiva, sus números de identificación) con valores de P_{sex} significativos en 10 infrapoblaciones ovinas de *Fasciola hepatica*.

ID	N	9	12	14	15	16	17	20	24	26	27	36	42	44	46	48	51	56	65	67	70
MBO1	21					6			9												
MBO2	9										6										
MBO3	11								5												
MBO4	5												2								
MBO5	10				4										2						
MBO6	26						2				2			3		4	2	1			2
MBO7	11	8	2																1		
MBO8	11			2				2													
MBO9	13													1		2	2				
MBO10	6																			2	
Total	123	8	2	2	4	4	6	2	2	5	9	2	6	2	4	2	6	2	2	2	2

ID: número de identificación; N: número de parásitos analizados por hospedador, después de excluir los genotipos en los que faltan datos (MLGs incompletos).

Estos 20 MLGs multicopia, supuestamente clones, fueron estadísticamente significativos para $n = 2$ ($P_{\text{sex}} < 0,05$), excepto dos, MLG 16 y MLG 26, representados por seis y nueve copias respectivamente. Estos dos últimos presentaron valores de P_{sex} significativos para $n = 3$, lo que sugiere que, como máximo, cinco individuos con MLG 16 y ocho con MLG 26 pueden ser clones. Los individuos con MLGs idénticos se presentaron en el mismo hospedador con mayor frecuencia que la esperada por azar ($P < 0,05$), de hecho solo tres MLGs multicopia estuvieron presentes en infrapoblaciones diferentes.

DESVIACIÓN DEL EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG Y DESEQUILIBRIO GENOTÍPICO

Después de reducir los MLGs multicopia estadísticamente significativos a un único ejemplar en cada muestra, los niveles de variabilidad genética en las poblaciones geográficas de *F. hepatica* que parasitan al ganado bovino y ovino fueron similares (Tabla 11). Aunque la población estudiada en ovejas presentó el mayor tamaño de muestra ($N = 98$), estando constituida en realidad por una mezcla de varias infrapoblaciones, esta no mostró mayor riqueza alélica que las poblaciones bovinas, representadas por una sola infrapoblación. La heterocigosis media esperada en el HWE de las infrapoblaciones bovinas de *F. hepatica* fue del 41,1 %. Todas las poblaciones geográficas, excepto BOV1, mostraron un déficit global de heterocigotos estadísticamente significativo respecto a las frecuencias genotípicas previstas en el HWE. El 31 % de las combinaciones de pares de loci probadas manifestaron un desequilibrio genotípico significativo en MBO; sin embargo, de las infrapoblaciones estudiadas en ganado vacuno solo una (CCD) presentó un porcentaje similar, mientras que seis de las restantes revelaron un desequilibrio genotípico mayor que el esperado por azar. En general, tales asociaciones no implicaron a los mismos loci, aunque el locus *FH222CBP* formó parte de dichos pares de manera recurrente.

Tabla 11. Tamaño de muestra (N), desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (F_{IS}), número de combinaciones de pares de loci que se encuentran en desequilibrio genotípico significativo (GD) con $P < 0,05$ (entre paréntesis el número de combinaciones probadas), heterocigosis esperada (H_e) y riqueza alélica (AR) para 10 poblaciones geográficas de *Fasciola hepatica* en ganado bovino (ID: número de identificación) y una en ganado ovino (MBO). Los datos fueron calculados después de reducir los MLGs repetidos significativos a un único ejemplar en cada muestra. Se incluyen los genotipos en los que faltan datos (MLGs incompletos).

	ID	N	F_{IS}	GD	H_e	AR
ABG	1	36	0,309*	3 (66)	0,378	3,292
BOV2	2	45	0,276*	2 (66)	0,428	3,641
CHAN	3	37	0,289*	10 (65)	0,395	3,220
COL	4	33	0,263*	7 (66)	0,421	3,265
MES	5	32	0,408*	5 (66)	0,397	3,363
CER	6	48	0,346*	12 (66)	0,426	3,442
MEL	7	37	0,214*	5 (66)	0,393	3,087
CCD	8	49	0,276*	20 (66)	0,429	3,166
GUN	9	53	0,254*	4 (55)	0,404	3,522
BOV1	10	43	0,118	7 (66)	0,438	3,530
MBO	-	98	0,293*	20 (65)	0,404	3,188

* $P < 0,0045$

Las desviaciones del HWE detectadas en cada población estuvieron principalmente asociadas a los loci *Pgm-2*, *FH15* y *FH23* (Tabla 12). Así, el locus *Pgm-2* reveló déficits de heterocigotos estadísticamente significativos en cada una de las 11 poblaciones estudiadas, mientras que los loci *FH15* y *FH23* manifestaron deficiencias de heterocigotos en nueve y en 10 de ellas, respectivamente. El exceso de homocigotos fue particularmente acusado para *Pgm-2* en las infrapoblaciones BOV2 y COL, observándose una ausencia total de heterocigotos para este locus en la infrapoblación CHAN. Asimismo, los loci *Aco*, *Ak*, *FH222CBP* y *FH25* manifestaron importantes desviaciones del equilibrio en, al menos, alguna de las

infrapoblaciones analizadas. Solo cinco de los 12 loci examinados (*Got-1*, *Hk*, *Idh*, *Pgd* y *Pgm-1*), no revelaron desviaciones significativas en ninguna de las poblaciones estudiadas. Cuando los loci *Pgm-2*, *FH15* y *FH23* fueron excluidos del conjunto de datos, las infrapoblaciones de *F. hepatica* se ajustaron a los valores esperados en condiciones de apareamiento aleatorio.

En las infrapoblaciones ovinas, la mayor parte de los loci analizados mostraron frecuencias genotípicas acordes con los valores esperados en el HWE (Tabla 13). Solo cuatro loci (*Pgm-2*, *FH15*, *FH23* y *FH25*) revelaron defectos de heterocigotos estadísticamente significativos en alguna de las infrapoblaciones estudiadas. Los déficits de heterocigotos fueron totales para *Ak* y *Pgm-2* en MBO1, *FH15* en MBO8 y *FH23* en MBO1, MBO3, MBO5 y MBO10.

Una vez identificados los clones en las infrapoblaciones ovinas, se llevó a cabo el análisis de estructura genética poblacional con y sin las copias repetidas de los MLGs, con el fin de evaluar el efecto que ejerce la reproducción asexual sobre la misma (Tabla 14). Así, cuando los datos de las ovejas fueron analizados incluyendo los clones, se incrementó el desequilibrio genotípico y disminuyó el grado de desviación del HWE cuantificado mediante el estadístico F_{IS} . El incremento en el porcentaje de las combinaciones de pares de loci que manifestaron un desequilibrio genotípico significativo varió entre el 5,55 % (MBO4) y el 36,11 % (MBO2 y MBO7); la infrapoblación MBO10 fue la única que no experimentó variación alguna en dicho porcentaje. Cabe destacar que tras la reducción de todos los grupos con el mismo MLG a un único ejemplar en cada muestra, la heterocigosis media esperada en el HWE de las infrapoblaciones ovinas de *F. hepatica* fue del 36 %, porcentaje similar al estimado en ganado bovino. Además, tras la exclusión de los clones, no se modificó en ningún caso la significación estadística de los valores F_{IS} estimados, de tal manera que las infrapoblaciones MBO1, MBO2, MBO3, MBO7 y MBO10 continuaron mostrando un déficit global de heterocigotos no estadísticamente significativo respecto a las frecuencias previstas en el HWE.

Tabla 12. Estimador de Weir y Cockerham del estadístico F_{IS} de Wright por locus para 10 poblaciones geográficas de *Fasciola hepatica* en ganado bovino y una en ganado ovino (MBO). Los datos fueron calculados después de reducir todos los grupos estadísticamente significativos de MLGs idénticos a un único ejemplar en cada muestra. Se incluyen los genotipos en los que faltan datos (MLGs incompletos).

	ABG	BOV2	CHAN	COL	MES	CER	MEL	CCD	GUN	BOV1	MBO
Aco	0,367	0,562*	0,224	0,480	0,844*	0,697*	0,172	0,277	0,393	0,112	0,354
Ak	0,377	0,600*	0,500	0,344	0,688*	0,500*	0,251	0,676*	0,477*	0,077	0,161
Got-1	0,286	-0,100	0,054	-0,140	0,363	-0,039	-0,059	-0,043	-0,045	0,067	-0,131
Hk	0,367	0,048	0,173	0,133	0,341	0,269	0,303	-0,013	0,355	0,229	0,116
Idh	0,014	-0,146	-0,075	-0,170	0,294	0,026	-0,073	-0,143	0,096	-0,200	-0,056
Pgd	-0,070	0,174	-0,059	0,306	0,299	0,072	-0,096	0,074	-0,156	0,011	0,177
Pgm-2	0,858*	0,921*	1,000*	0,942*	0,805*	0,738*	0,759*	0,834*	0,735*	0,277*	0,651*
Pgm-1	-0,014	-0,023	-	0,364	-0,107	-0,044	-	-	-	-	0,000
FH15	0,637*	0,637*	0,248	0,674*	0,178	0,656*	0,759*	0,536*	0,567*	0,320*	0,533*
FH222CBP	-0,025	-0,040	0,076	-0,006	0,027	0,017	-0,005	-0,073*	0,026	-0,064	0,129
FH23	0,534*	0,575*	0,725*	0,484*	0,827*	0,600*	0,281	0,514*	0,267*	0,379*	0,684*
FH25	0,185	-0,082	-0,126	-0,086	0,093	0,435*	-0,075	-0,123	0,022	0,101	0,189

* $P < 0,0042$

Tabla 13. Estimador de Weir y Cockerham del estadístico F_{IS} de Wright por locus para 10 infrapoblaciones de *Fasciola hepatica* en ganado ovino. Los datos fueron calculados después de reducir todos los grupos estadísticamente significativos de MLGs idénticos a un único ejemplar en cada muestra. Se incluyen los genotipos en los que faltan datos (MLGs incompletos).

	MBO1	MBO2	MBO3	MBO4	MBO5	MBO6	MBO7	MBO8	MBO9	MBO10
Aco	-	-	-	0,000	0,000	0,454	0,000	-	0,600	-0,143
Ak	1,000	-0,333	0,437	0,741	-0,053	-0,027	-0,111	0,268	-0,209	-0,143
Got-1	-0,111	-0,333	-0,059	-0,167	-0,053	-0,185	-	-0,053	0,000	0,000
Hk	-0,053	-	-0,200	0,741	-	-0,091	-0,143	0,250	-0,011	-0,333
Idh	-0,143	0,000	-0,200	-0,077	0,643	-0,032	0,615	-0,667	-0,130	-0,143
Pgd	-0,111	0,273	-0,116	0,000	-0,273	-0,454	0,333	0,643	0,250	0,000
Pgm-2	1,000*	0,600	0,847*	0,650	0,589	0,286	0,286	0,459	0,876*	0,273
Pgm-1	-	-	-	-	-	-	-	0,000	-	-
FH15	-	0,000	0,323*	0,500	-	0,660	-	1,000	0,307	-
FH222CBP	0,540	0,543	-0,067	-0,143	0,085	0,005	-0,042	0,524	-0,230	0,273
FH23	1,000	0,625	1,000	0,667	1,000*	0,623*	-0,103	0,604	0,323	1,000
FH25	-0,351	0,000	-0,301	-0,111	-0,167	0,511*	-0,053	-0,071	0,683*	0,238

* $P < 0,0042$

Tabla 14. Tamaño de muestra (N), desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (F_{is}), número de combinaciones de pares de loci que se encuentran en desequilibrio genotípico significativo (GD) con $P < 0,05$ (entre paréntesis el número de combinaciones probadas), heterocigosis esperada (H_e) y riqueza alélica (AR) para 10 infrapoblaciones de *Fasciola hepatica* en ganado ovino. Los datos fueron calculados a partir de muestras con (c) y sin (s) MLGs repetidos. En los tests sin MLGs repetidos, todos los grupos estadísticamente significativos de MLGs idénticos se redujeron a un único ejemplar en cada muestra. Se incluyen los genotipos en los que faltan datos (MLGs incompletos).

	N		F_{is}		GD		H_e		AR	
	c	s	c	s	c	s	c	s	c	s
MBO1	25	11	0,027	0,256	18 (36)	10 (36)	0,172	0,281	0,587	1,825
MBO2	12	5	0,059	0,255	13 (36)	0 (36)	0,270	0,341	1,841	1,946
MBO3	14	10	0,078	0,168	17 (45)	4 (45)	0,374	0,417	2,210	2,243
MBO4	10	8	0,231*	0,266*	4 (54)	1 (54)	0,369	0,411	2,308	2,286
MBO5	12	11	0,261*	0,244*	12 (36)	7 (36)	0,310	0,300	2,150	2,009
MBO6	27	17	0,182*	0,161*	21 (55)	12 (55)	0,358	0,386	2,087	2,092
MBO7	13	6	0,079	0,099	13 (36)	0 (36)	0,258	0,358	1,888	2,097
MBO8	14	11	0,248*	0,304*	22 (54)	15 (54)	0,299	0,343	1,979	1,990
MBO9	16	14	0,229*	0,248*	15 (55)	6 (55)	0,415	0,432	2,335	2,281
MBO10	6	5	0,087	0,134	0 (45)	0 (45)	0,304	0,327	1,996	1,974

* $P < 0,005$

ESTRUCTURA POBLACIONAL Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

La diferenciación genética entre infrapoblaciones fue mayor en el caso de las ovejas que en el de las vacas (Tabla 15), lo cual es particularmente llamativo cuando se tiene en cuenta que solo las infrapoblaciones correspondientes a las vacas estuvieron geográficamente distanciadas. Así, después de eliminado el “ruido” en los datos correspondientes a vacas y ovejas, ocasionado por el diferente impacto que sobre la estructura poblacional ejerció la reproducción asexual del parásito, el porcentaje de variación atribuible a las diferencias entre especímenes de distintas infrapoblaciones fue el 8,7 % y el 17 % en el ganado bovino y ovino, respectivamente. En ambos tipos de ganado, más del 20 % de la variación se encontró entre especímenes procedentes de un mismo individuo hospedador. Dado que el número de MLGs multicopia estadísticamente significativos observado en las poblaciones geográficas del ganado bovino fue bajo, los resultados cambiaron muy poco cuando estos se incluyeron en el conjunto de datos; sin embargo, la inclusión de los clones en el análisis incrementó claramente el nivel de estructuración genética entre las infrapoblaciones ovinas.

Tabla 15. Estimadores de Weir y Cockerham de los estadísticos F de Wright en ganado bovino y ovino para el conjunto de datos con (c) y sin (s) MLGs repetidos. Se muestran entre paréntesis los F_{ST} estandarizados (Meirmans, 2006). Todos los valores son estadísticamente significativos ($P < 0,05$).

	F_{IS}		F_{ST}		F_{IT}	
	c	s	c	s	c	s
Vacas	0,273	0,271	0,059 (0,100)	0,051 (0,087)	0,316	0,308
Ovejas	0,156	0,217	0,224 (0,324)	0,108 (0,170)	0,345	0,301

A pesar del escaso grado de estructuración genética observado en *F. hepatica* que parasita al ganado vacuno, los valores de F_{ST} entre pares de infrapoblaciones fueron estadísticamente significativos en la mayor parte de los casos (Tabla 16).

Tabla 16. Diferenciación genética entre pares de infrapoblaciones (IP) de *Fasciola hepatica* calculada mediante el estimador de Weir y Cockerham del estadístico F_{ST} de Wright para el ganado ovino (por encima de la diagonal) y bovino (por debajo de la diagonal). Los números de identificación de cada infrapoblación se muestran en las Tablas 10 y 11.

	IP1	IP2	IP3	IP4	IP5	IP6	IP7	IP8	IP9	IP10
IP1	-	0,257	0,146	0,162	0,277*	0,172*	0,171	0,178*	0,137*	0,309
IP2	0,028*	-	0,138	0,020	0,111	0,077	0,000	0,081	0,104	0,023
IP3	0,045*	0,024	-	0,092	0,206*	0,047	0,080	0,171	0,060	0,135
IP4	0,034	0,005	0,037*	-	0,099	0,030	0,000	0,074	0,057	0,134
IP5	0,032*	0,002	0,036*	0,013	-	0,066	0,000	0,163*	0,079	0,147
IP6	0,053*	0,013*	0,052*	0,030	0,013*	-	0,000	0,149*	0,004	0,065
IP7	0,092*	0,082*	0,092*	0,101*	0,088*	0,096*	-	0,050	0,011	0,032
IP8	0,086*	0,068*	0,069*	0,103*	0,071*	0,073*	0,017	-	0,126*	0,166
IP9	0,087*	0,044*	0,044*	0,065*	0,054*	0,048*	0,027*	0,024*	-	0,079
IP10	0,086*	0,047*	0,059*	0,085*	0,064*	0,054*	0,021*	0,016	0,009	-

* $P < 0,0011$

Los valores correspondientes a los parásitos de ovejas fueron altamente variables, oscilando entre 0 y 0,309; y solo algunas comparaciones resultaron estadísticamente significativas. En el ganado bovino, los valores de diferenciación más elevados se detectaron entre los pares de infrapoblaciones COL (IP4)-MEL (IP7) y COL (IP4)-CCD (IP8).

Si las infrapoblaciones ovinas se agrupan según la fecha de muestreo (2006: MBO1, MBO2, MBO3 y MBO4; 2008: MBO6, MBO7, MBO8, MBO9 y MBO10), el AMOVA determina que no existen diferencias significativas entre muestras temporales (Tabla 17). Así, la diferenciación entre ellas únicamente representa el 0,79 % de la diversidad genética total. La variación se debe principalmente a diferencias dentro de las infrapoblaciones (88,45 %) y, en menor grado, a diferencias entre infrapoblaciones dentro de cada muestra temporal (10,76 %).

Tabla 17. Análisis de varianza molecular (AMOVA) según la fecha de muestreo en el ganado ovino (2006/2008). d.f.: grados de libertad.

Fuente de variación	d.f.	Suma de cuadrados	Componentes varianza	% Variación	Estadísticos <i>F</i>
Entre los grupos	1	8,85	0,019	0,79	0,008 (F_{CT})
Entre las infrapoblaciones dentro de los grupos	8	49,43	0,269	10,76	0,108* (F_{SC})
Dentro de las infrapoblaciones	186	356,67	2,212	88,45	0,115* (F_{ST})
Total	195	414,95	2,500	100	--

* $P < 0,0001$

Análogamente, si las muestras se definen en función de la especie hospedadora (Tabla 18), la mayor parte de las diferencias se observan, una vez más, dentro de las infrapoblaciones (90,16 %) y solo un 3,51 % de la diversidad se debe a diferencias entre parásitos de distintas especies hospedadoras.

Tabla 18. Análisis de varianza molecular (AMOVA) según la especie hospedadora. d.f.: grados de libertad.

Fuente de variación	d.f.	Suma de cuadrados	Componentes varianza	% Variación	Estadísticos F
Entre los grupos	1	37,25	0,094	3,51	0,035* (F_{CT})
Entre las infrapoblaciones dentro de los grupos	18	192,14	0,169	6,33	0,065* (F_{SC})
Dentro de las infrapoblaciones	806	2355,31	2,409	90,16	0,098* (F_{ST})
Total	825	2584,70	2,672	100	--

* $P \leq 0,0001$

La diferenciación genética entre las infrapoblaciones se estimó además mediante distancias genéticas D_a (Tabla 19). Tales distancias variaron entre 0,023 y 0,094 en vacas y entre 0,033 y 0,156 en ovejas. Estos resultados se encuentran en concordancia con los valores de diferenciación genética entre pares de infrapoblaciones estimados con el estadístico F_{ST} . Así, las infrapoblaciones ovinas mostraron, en general, valores de distancia genética más elevados que los obtenidos entre las poblaciones bovinas, que manifestaron una escasa diferenciación genética. Este hecho es consistente con las diferencias detectadas en las estructuras genéticas de sus poblaciones. Es interesante observar que la infrapoblación BOV2 (IP2) guarda un parecido genético mayor con algunas de las infrapoblaciones estudiadas que con aquella con la que comparte localidad (BOV1; IP10).

Tabla 19. Matriz de las distancias genéticas de Nei (D_a) entre infrapoblaciones (IP) de *Fasciola hepatica* representadas en la parte superior para el ganado ovino y en la parte inferior para el ganado bovino. Los números de identificación de cada infrapoblación se muestran en las Tablas 10 y 11.

	IP1	IP2	IP3	IP4	IP5	IP6	IP7	IP8	IP9	IP10
IP1	-	0,137	0,090	0,115	0,156	0,101	0,091	0,105	0,096	0,134
IP2	0,038	-	0,144	0,103	0,111	0,102	0,077	0,114	0,129	0,076
IP3	0,045	0,032	-	0,098	0,153	0,069	0,100	0,118	0,085	0,116
IP4	0,040	0,027	0,034	-	0,104	0,035	0,058	0,072	0,059	0,125
IP5	0,046	0,032	0,040	0,029	-	0,082	0,057	0,106	0,083	0,122
IP6	0,045	0,038	0,049	0,033	0,031	-	0,046	0,086	0,033	0,076
IP7	0,072	0,080	0,085	0,082	0,079	0,087	-	0,063	0,043	0,068
IP8	0,075	0,072	0,083	0,094	0,084	0,078	0,030	-	0,086	0,118
IP9	0,072	0,063	0,069	0,071	0,071	0,066	0,031	0,037	-	0,098
IP10	0,070	0,057	0,074	0,085	0,079	0,070	0,034	0,030	0,023	-

A partir de la matriz de distancias genéticas D_a , se construyó un árbol filogenético mediante el método de Neighbor-Joining (Figura 5). De este análisis derivan tres resultados básicos: 1) las ramas más largas corresponden a las infrapoblaciones ovinas, 2) se distinguen claramente dos grupos genéticamente diferenciados de infrapoblaciones bovinas, y 3) no hay asociación aparente entre las distancias genéticas y geográficas.

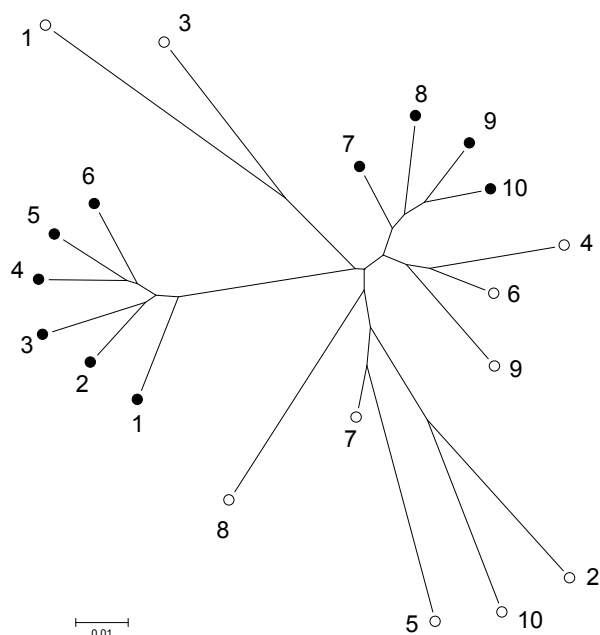


Figura 5. Árbol filogenético sin raíz obtenido a partir de las distancias genéticas de Nei (D_a) mediante Neighbor-Joining que incluye a las 20 infrapoblaciones de *Fasciola hepatica* procedentes del ganado ovino (círculos blancos) y bovino (círculos negros). Los números de identificación de cada infrapoblación se muestran en las Tablas 10 y 11.

Mediante un FCA, se observa como las infrapoblaciones bovinas que constituyen los dos grupos definidos por el análisis filogenético están integradas por individuos genéticamente muy similares, en lo que a su composición alélica respecta (Figura 6). Este resultado está en consonancia con las pequeñas distancias genéticas estimadas entre las infrapoblaciones, así como con los bajos valores de F_{ST} calculados.

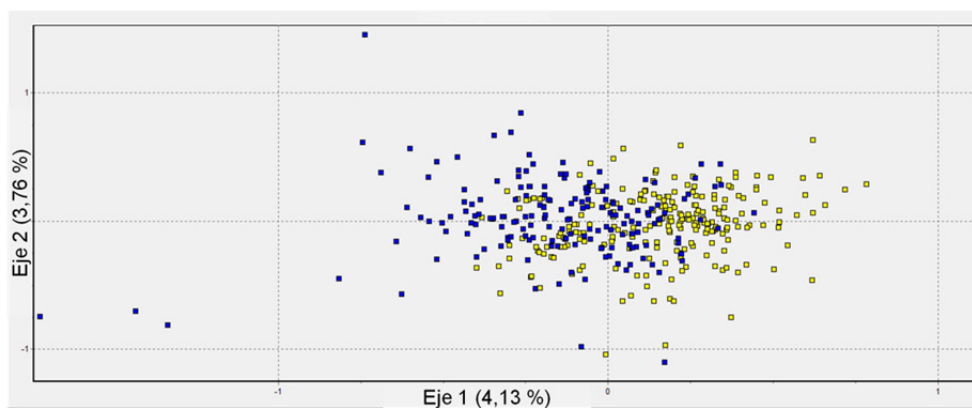


Figura 6. Representación gráfica del análisis factorial de correspondencias (FCA) incluyendo a los individuos de *Fasciola hepatica* procedentes de las infrapoblaciones bovinas IP1-IP6 (cuadrados amarillos) e IP7-IP10 (cuadrados azules), según los dos primeros ejes.

DISCUSIÓN

ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE *FASCIOLA HEPATICA* EN GANADO BOVINO Y OVINO

Las poblaciones geográficas estudiadas presentaron niveles de variabilidad similares a los estimados en otras poblaciones de digeneos (Lydeard *et al.*, 1989; Vilas *et al.*, 2004; Prugnolle *et al.*, 2005c; Criscione y Blouin, 2006). De hecho, al menos en lo referente a la cantidad de variación alozímica observada, resultó similar a la detectada en invertebrados de vida libre no artrópodos (Nadler, 1987). Estos resultados sugieren la existencia de fenómenos que contrarrestan ciertas causas que teóricamente explicarían una menor variabilidad genética, las cuales son inherentes a la forma de vida parasitaria o bien caracterizan al ciclo de vida de este parásito en particular. Por ejemplo, es sabido que la fragmentación de la población en grupos de individuos reproductores, representados por las infrapoblaciones, reduce el tamaño efectivo de población (Criscione y Blouin, 2005). Esto significa que las poblaciones de parásitos sufrirán mayores efectos de deriva genética, entre ellos la pérdida de alelos y el incremento del grado de autocigosis, haciendo que la variabilidad genética mantenida en el equilibrio mutación-deriva disminuya (Hedrick, 2009). Otro ejemplo, en este caso relacionado con una característica particular del ciclo vital, es el planteado por la reproducción asexual a la que está obligada la especie *F. hepatica*; fenómeno que, en combinación con la posibilidad de autofecundación, debería incrementar los índices de consanguinidad de la población y así, la frecuencia de individuos homocigotos. Entre los hechos que contrarrestarían tales factores, sin duda deberían contarse las enormes fecundidades que caracterizan a la mayor parte de los helmintos parásitos, incluidos los digeneos, así como prevalencias e intensidades de parasitación a menudo elevadas.

Los niveles de variabilidad genética revelados por *F. hepatica* difirieron significativamente en función de la especie hospedadora. Así, pudo observarse que las infrapoblaciones que parasitan al ganado ovino suelen ser menos variables, especialmente si la variación es cuantificada por el número de alelos o la riqueza alélica (el efecto es menos acusado sobre la heterocigosis). Por supuesto, tales comparaciones deben realizarse una vez identificados los clones potenciales y excluidos del análisis los individuos con el mismo genotipo multilocus

presuntamente clonales. Esto es importante porque la presencia de clones perturba los datos poblacionales, eclipsando el efecto que la reproducción sexual en el hospedador definitivo ejerce sobre la variación de la población en general. Por ejemplo, la clonalidad no detectada puede ser causa de un exceso de heterocigotos, que oculte datos tan interesantes como déficits genotípicos, los cuales pueden representar evidencias de consanguinidad o subdivisión poblacional (Criscione *et al.*, 2011). Como se verá más adelante, este riesgo es mayor en el caso de la población que parasita al ganado ovino, pues la presencia de clones fue particularmente abundante en este hospedador.

Las poblaciones que parasitan al ganado bovino y ovino difirieron en sus niveles de variabilidad genética, pero además se han detectado fuertes evidencias que sugieren que su distribución a lo largo del espacio geográfico es muy diferente dependiendo de la especie hospedadora. Así, en el ganado ovino, se observa una mayor estructuración genética a nivel infrapoblacional, es decir, la diferenciación genética entre infrapoblaciones es sustancialmente mayor para los parásitos de ovejas. Este resultado es especialmente sorprendente cuando se tiene en cuenta que todas las ovejas estudiadas formaron parte de un mismo rebaño, mientras que cada vaca pertenecía a una granja diferente y algunas de estas explotaciones se hallaban bastante alejadas geográficamente entre sí. De hecho, una vez considerada la diferencia en la composición de clones, excluyendo su efecto sobre la variación, la fracción de la desviación del HWE atribuible a diferencias entre individuos de distintas infrapoblaciones fue del 8,7 % en el caso de las vacas y del 17 % en el caso de las ovejas. Esta diferencia fue confirmada mediante el cálculo de distancias genéticas absolutas, ya que las infrapoblaciones ovinas mostraron generalmente valores más elevados que los calculados entre las poblaciones bovinas. Luego, ovejas de un mismo rebaño albergaron conjuntos de parásitos con mayores diferencias genéticas que las observadas en el caso de vacas procedentes de granjas ubicadas en distintas localidades geográficas.

Otro dato que confirma el mayor grado de estructuración observado en *F. hepatica* del ganado ovino se refiere a la desigual presencia de clones. Al contrario de lo observado en las infrapoblaciones de ganado bovino, los grupos de parásitos con MLGs idénticos fueron frecuentes en la población que parasita a

ovejas. Además, el análisis realizado en el presente estudio indicó que la mayor parte de los individuos que muestran un mismo MLG son el resultado de la reproducción asexual que se produce en el hospedador intermediario. Así pues, en las ovejas se detectaron muchos más clones que en las vacas, lo cual sugiere en las primeras un grado de mezcla de parásitos de origen diverso considerablemente menor. En otras palabras, la presencia de clones en las ovejas es indicativa de transmisión agregada en el parásito, lo cual es consecuencia de la distribución no aleatoria del parásito en los pastos, así como de una movilidad del individuo hospedador relativamente escasa. Individuos genéticamente idénticos, resultado de la amplificación asexual producida en el caracol, tienden a permanecer juntos como metacercarias y, a menudo, son incorporados conjuntamente al hospedador definitivo, explicando así la presencia de clones en la infrapoblación. Otra evidencia de transmisión agregada, que además refuerza la hipótesis de que los grupos de MLGs idénticos que se han identificado definen verdaderos clones, es la fuerte asociación estadística entre estos grupos y los hospedadores individuales, es decir, los individuos genéticamente idénticos no se distribuyeron aleatoriamente en los individuos hospedadores. La mayor frecuencia de clones en las ovejas podría también estar relacionada con las diferencias en longevidad que exhiben los parásitos según se hallen en ovejas o vacas. Se cree que *F. hepatica* puede llegar a vivir tanto como sus hospedadores ovinos, mientras que solo persiste de uno a dos años en los conductos biliares del ganado bovino (Rojo-Vázquez y Ferre-Pérez, 1999; Robinson *et al.*, 2008). Esta diferencia supone una mayor rapidez en la formación de nuevas infrapoblaciones en el caso de las vacas, lo cual conllevaría a su vez la menor acumulación de clones distintos.

Sin embargo, el hecho de que la estructura clonal a nivel infrapoblacional no se observe en las vacas en un grado similar, es probablemente debido a un mayor flujo génico entre poblaciones de las dueñas que parasitan a vacas, el cual puede deberse a varias razones. Por ejemplo, la costumbre de alimentarlas con forraje almacenado, procedente de diferentes lugares y potencialmente contaminado con metacercarias de distintas poblaciones; una mayor movilidad de las reses; un acceso dispar a extensiones de pasto mucho mayores que las reservadas a las ovejas; así como la reunión del ganado procedente de distintas granjas en ferias u otros eventos en los que pueda infectarse de una misma fuente, son factores que

contribuyen a explicar la mayor homogeneidad genética observada entre las infrapoblaciones de *F. hepatica* que parasitan al ganado bovino, esto es, la menor diferenciación entre infrapoblaciones. De hecho, en la zona de estudio, el número de explotaciones bovinas es muy abundante llegando a contener cientos de miles de vacas distribuidas en más de medio millón de hectáreas. Además, a diferencia de las ovejas que con frecuencia pastan en un número limitado de parcelas, como es en el caso de la granja estudiada, el ganado vacuno es alimentado con pastos procedentes de múltiples fuentes, ya que las vacas mantenidas en pastoreo, con frecuencia, son también alimentadas con forraje almacenado de origen foráneo. Por otro lado, no resulta inusual la compartición de zonas de pastoreo, así como el movimiento e intercambio de ganado entre granjas, factor que puede ser determinante en la conformación de la estructura genética de las poblaciones de helmintos parásitos (Blouin *et al.*, 1995).

La mezcla en hospedadores individuales de conjuntos de parásitos procedentes de poblaciones genéticamente distintas, ya sea por la alimentación con forraje o el mayor rango de distribución y movilidad del ganado bovino, es una hipótesis coherente con otro resultado interesante: todas las infrapoblaciones en vacas, salvo BOV1, mostraron fuertes déficits de heterocigotos con respecto a lo esperado bajo panmixia. Sin embargo, las frecuencias genotípicas en las infrapoblaciones correspondientes a las ovejas generalmente no se desviaron de los valores predichos por el HWE (por supuesto, las desviaciones fueron notables para el componente poblacional en su conjunto debido a que las infrapoblaciones fueron muy diferentes). Esta discrepancia es coherente con la mezcla de parásitos de distintos orígenes en las vacas, ya que los déficits de heterocigotos serían atribuibles al efecto Wahlund. Un examen pormenorizado de tales desviaciones concuerda con esta explicación porque los déficits detectados son muy variables para los distintos loci (algunos de ellos ni siquiera muestran desviación significativa); otra causa frecuente del defecto de heterocigotos en poblaciones naturales como la consanguinidad es un fenómeno que teóricamente debería afectar a todo el genoma por igual (Hedrick, 2009). Luego, las diferencias en el grado de estructuración genética observado en *F. hepatica* según la especie hospedadora podrían deberse a diferencias en los niveles de flujo génico.

Una segunda explicación no excluyente es que las poblaciones ovinas del parásito experimenten mayores efectos de deriva genética, lo cual aumentaría la diferenciación entre las infrapoblaciones. Así, las diferencias en flujo génico y en la presencia de clones podrían explicar un menor tamaño efectivo en la población que parasita a las ovejas. Un factor crítico que intervendría en este sentido es la menor intensidad de parasitación que caracteriza a las ovejas. Evidentemente, si la población está subdividida en grupos más pequeños de individuos reproductores, la población manifestará mayores efectos de deriva que una población no subdividida con el mismo tamaño censal y que satisfaga las condiciones del modelo Wright-Fisher. En teoría, la presumible mayor longevidad del parásito en las ovejas debería favorecer el solapamiento intergeneracional, lo cual aumentaría el flujo temporal en la población, particularmente si las ovejas se infectan con frecuencia. Como consecuencia de ello, se esperaría un aumento de la variabilidad genética que no se observa en relación con la población que parasita a vacas. Y es que este efecto debe verse contrarrestado por otros procesos, tales como el frecuente cruzamiento entre individuos clonales o el bajo flujo génico espacial. Además, si se consideran conjuntamente las diferencias en intensidad de parasitación y longevidad del parásito, resulta razonable suponer que la infección de las ovejas es relativamente poco frecuente.

La menor riqueza alélica y la notable mayor longitud de las ramas del árbol de Neighbor-joining correspondientes a las infrapoblaciones en ovejas son resultados coherentes con la hipótesis de un menor tamaño efectivo de población, como causa probable de la diferencia en el grado de estructuración genética observada en *F. hepatica*, dependiendo de la especie hospedadora. El hecho de que no se hayan detectado diferencias estadísticamente significativas entre muestras temporales de la misma población de duelas de ovejas y que la fracción de la variación correspondiente (menor del 1 %) sea relativamente pequeña, concuerda con la hipótesis de longevidad relativamente elevada y, por consiguiente, cierta estabilidad demográfica. Esto significa que los presuntamente fuertes efectos de deriva que experimentaría la población que parasita a ovejas, en comparación con los parásitos de vacas, no se debería fundamentalmente a la existencia de fuertes fluctuaciones demográficas a nivel infrapoblacional (aunque probablemente existen para las dos poblaciones, asociadas a la complejidad del ciclo biológico), sino a

otros factores ya mencionados, tales como la menor intensidad de parasitación o la mayor probabilidad de cruzamientos entre individuos genéticamente idénticos. Otra posibilidad es que la menor intensidad de parasitación esté correlacionada con un mayor índice de autofecundación, pues el encuentro de parejas de helmintos es menos probable. Luego, diferencias en la estructura reproductiva de la población asociadas a la parasitación de diferentes especies hospedadoras podrían contribuir a explicar la menor variabilidad intrapoblacional y el mayor grado de diferenciación genética entre infrapoblaciones observado en los parásitos de ovejas.

La frecuente presencia de clones en las ovejas permitió evaluar los efectos que ejerce la reproducción asexual sobre la estructura genética, mediante una comparación del resultado del análisis de los datos según se considere o no la presencia de clones. Estos efectos fueron básicamente tres: la disminución de la desviación de las frecuencias genotípicas con respecto a los valores esperados en condiciones de apareamiento al azar, el aumento del desequilibrio genotípico y el incremento de la estructura genética a nivel poblacional. Estos resultados concuerdan con recientes estudios teóricos y experimentales (Prugnolle *et al.*, 2005a,b; Criscione *et al.*, 2011) que arrojan conclusiones tan poco intuitivas como el incremento de la heterocigosis debido a la presencia de clones en la muestra analizada. Además, advierten del riesgo de malinterpretar los datos genéticos que sugieran apareamiento aleatorio predominante, cuando el ciclo biológico de las especies estudiadas incluye mecanismos de amplificación clonal (Prugnolle y De Meeûs, 2010; Vilas *et al.*, 2011). Así, poblaciones altamente consanguíneas pueden no revelar desviaciones importantes del HWE, si el grado de clonalidad no se considera apropiadamente. Estas razones son más que suficientes para justificar la exclusión de los individuos clonales de los análisis realizados, que nos ha permitido vislumbrar lo que parecen claras evidencias de estructura genética poblacional variable, según el parásito habite en vacas u ovejas. Como se tratará más adelante, esta diferencia, observada en el noroeste de España, pero relacionada con aspectos que son comunes en diferentes contextos geográficos, tiene importantes implicaciones para la aparición y extensión de resistencias frente a fármacos antihelmínticos en la cabaña ganadera del país. No obstante, la comparación entre los resultados de los análisis de estructura poblacional con y sin clones apoya igualmente la hipótesis de la

constitución de infrapoblaciones en el ganado ovino a partir de una mezcla más bien pobre de parásitos individuales, tanto antes como después de la reproducción asexual, puesto que el índice de fijación (F_{ST}) es en ambos casos relativamente elevado. No sorprenderá esta deducción si se tiene en cuenta que antes de la reproducción asexual, la mezcla previa a la formación de nuevos grupos de individuos reproductores en el hospedador definitivo depende críticamente de lo que podrían no ser más que infructuosas exploraciones ovinas por tierras marginales; y mucho menos si se considera la capacidad de dispersión del miracidio, lábil forma larvaria, o del caracol, paradigma del obrar parsimonioso. Asimismo, después de la multiplicación asexual, las metacercarias emergentes han de enquistarse rápidamente sobre briznas de hierba expuestas al rumiante. En otras palabras, tanto la frecuencia de infección parasitaria como el flujo génico entre distintas poblaciones del parásito son menores en el caso de las ovejas, probablemente debido a la menor calidad de los pastos a los que tienen acceso y a la supuesta menor libertad de movimientos de que disfrutan.

Conviene hacer una discusión más detallada de las desviaciones del HWE detectadas. Después de reducir todos los grupos con el mismo MLG a una sola copia en el conjunto de los datos, las frecuencias genotípicas se ajustaron en general a los valores esperados en el HWE, particularmente en el caso de las infrapoblaciones muestreadas en ovejas. No obstante, se han detectado importantes déficits de heterocigotos estadísticamente significativos, siendo múltiples las causas de desviación del HWE en este sentido, tales como el apareamiento no aleatorio, ya sea basado en el parentesco (consanguinidad), en el fenotipo (apareamiento asociativo) o en la geografía (efecto Wahlund). Además, la selección en contra de los heterocigotos, la presencia de alelos nulos o de artefactos responsables de fenotipos nulos, que dificultan la distinción entre homocigotos y heterocigotos (pérdida de electromorfos por una conservación deficiente del material o mutaciones en las regiones flanqueantes del microsatélite impidiendo la correcta unión de los cebadores y así, la amplificación de ciertos alelos), son también factores que pueden explicar un exceso aparente de homocigotos. Sin embargo, tal y como anteriormente se ha relatado, las desviaciones detectadas parecen ser debidas a influencias específicas de locus, pues fueron de magnitud muy variable dependiendo del marcador. Así pues, a pesar de la posibilidad de

autofecundación y la probabilidad relativamente alta, en el caso de las ovejas, de apareamiento entre individuos pertenecientes al mismo clon, la consanguinidad no parece ser un factor importante que explique los déficits genotípicos observados, ya que la totalidad del genoma se ve implicada en el apareamiento entre individuos consanguíneos. Dada la sencillez anatómica y de comportamiento de estos organismos, resulta improbable el apareamiento asociativo. Asimismo, en virtud de la naturaleza generalmente no codificante de los loci microsatélites, se presume razonablemente que este tipo de marcadores son selectivamente neutrales. La misma consideración para los loci enzimáticos es más discutible, pero tal tratamiento es útil en la medida en que la teoría neutral sirve como hipótesis nula. Pero, incluso si tales marcadores neutrales reflejasen los efectos de la selección negativa actuando sobre un locus estrechamente ligado, la hipótesis de la selección natural como causa de las desviaciones detectadas sería poco plausible debido al número de loci relativamente elevado que revelaron desviaciones significativas. Aunque los alelos nulos son frecuentes en loci microsatélites, pero raros en loci enzimáticos, los defectos de heterocigotos afectaron indistintamente a alozimas y microsatélites. Además, considerando la intensidad de tales deficiencias, deberían observarse fenotipos nulos entre los loci enzimáticos, cosa que no ha ocurrido. Luego, la causa más probable de las desviaciones detectadas parece ser la subdivisión críptica. Esta hipótesis es coherente, por un lado, con la diferenciación entre infrapoblaciones procedentes de ovejas, de manera que, en la consideración del componente poblacional como una unidad panmíctica, el efecto Wahlund resultante debería ser acusado, lo que explicaría los fuertes déficits detectados; por otro, con la supuesta presencia en las infrapoblaciones del ganado vacuno de varios conjuntos de helmintos de orígenes diversos, un fenómeno atenuado en el caso de las ovejas. Asimismo, la presencia de asociaciones genotípicas significativas respalda la hipótesis de subdivisión críptica a nivel infrapoblacional. En la duela hepática *F. magna*, especie que parasita a rumiantes salvajes, se ha observado un patrón igualmente caracterizado por déficits de heterocigotos, aunque estadísticamente no significativos, por la presencia de numerosos helmintos con el mismo MLG en el interior de individuos hospedadores y la existencia de importantes diferencias genéticas entre infrapoblaciones (Mulvey *et al.*, 1991). Sin embargo, estos autores atribuyeron las desviaciones del HWE a la presencia de

clones. Estudios recientes han demostrado que la mera presencia de clones causa valores negativos de F_{IS} en lugar de valores positivos, es decir, su presencia debería percibirse como un exceso de heterocigotos (Balloux *et al.*, 2003; Prugnolle *et al.*, 2005a). Además, la presencia de clones supone un incremento del desequilibrio de ligamiento (el número de casos en los que se aprecian asociaciones genotípicas entre loci), así como del valor del estadístico F_{ST} (el grado de estructuración genética). Estas predicciones teóricas han sido corroboradas empíricamente tanto por Criscione *et al.* (2011) como por nuestros propios resultados, algunos de ellos recientemente publicados (Vilas *et al.*, 2012). Tales hallazgos posibilitan una interpretación más exacta de los datos obtenidos por Mulvey *et al.* (1991), interpretación que traemos a colación, ya que, para nuestro conocimiento, se trata del único estudio de estructura genética poblacional llevado a cabo con marcadores codominantes analizados a nivel infrapoblacional en otra duela hepática, además de *Fasciola*. Así pues, teniendo en cuenta los resultados expuestos en la presente memoria, parece probable que si los clones de *F. magna* hubieran sido convenientemente identificados y el análisis de datos realizado una vez colapsados cada uno de tales grupos en su correspondiente genotipo multilocus, el valor de F_{IS} aumentaría en las infrapoblaciones, probablemente hasta valores estadísticamente significativos, y el valor de F_{ST} no se vería inflado por la presencia de clones asociados a individuos hospedadores. Según esto, se puede especular que la estructura genética poblacional de *F. magna* se ajusta a un escenario a medio camino del planteado por *F. hepatica* en vacas (caracterizado por déficits estadísticamente significativos dentro de infrapoblaciones y tasas de flujo génico relativamente elevadas) y el observado en ovejas, donde las infrapoblaciones, siempre después de que los clones hayan sido colapsados, apenas manifiestan desviaciones del HWE, pero se encuentran notablemente diferenciadas a escala microespacial. En ambas especies, las desviaciones de la predicción bajo panmixia serían debidas a la incorporación de parásitos de orígenes distintos, lo cual depende críticamente de la movilidad del hospedador definitivo y de su rango de distribución. De acuerdo con las razones expuestas, la subestructuración poblacional como causa del efecto Wahlund es la principal explicación de las desviaciones detectadas, por lo que los resultados sugieren que el modo de reproducción predominante del parásito es la fecundación cruzada. Esta hipótesis

es coherente con el estudio preliminar de Hurtrez-Boussès *et al.* (2004) llevado a cabo en una población natural de *F. hepatica*, donde no se detectó evidencia alguna de consanguinidad o estructura clonal. La autofecundación parece ser, entonces, una estrategia reproductiva a la que el parásito recurre solamente cuando no encuentra a otros congéneres en el hospedador definitivo. La ausencia de evidencia de poblaciones altamente consanguíneas debida a la desviación de panmixia (seguramente la consanguinidad por deriva es mucho más importante, especialmente en el caso de las poblaciones que parasitan a las ovejas) explica los niveles relativamente elevados de heterocigosis que se han detectado en ambos hospedadores. El impacto de la deriva genética sobre la variabilidad se visualiza principalmente en la pérdida de alelos, fenómeno que puede atisbarse en el análisis comparativo.

A pesar de que no se estudiaron muestras geográficas de *F. hepatica* en ovejas, los resultados obtenidos sugieren fuerte heterogeneidad espacial en esta especie hospedadora. Por el contrario, las poblaciones geográficas analizadas en el ganado bovino mostraron distancias genéticas relativamente bajas. Este escaso grado de estructuración genética contrasta con el obtenido en estudios previos de *F. magna* (Lydeard *et al.*, 1989; Mulvey *et al.*, 1991), si bien, tal y como se ha afirmado anteriormente, es muy probable que, en este caso, el grado de estructuración haya sido sobrevalorado por no tener en cuenta la presencia de clones. Sin embargo, los datos correspondientes al ganado bovino son similares a los revelados por otros trabajos llevados a cabo con nematodos tricostrongílicos (Blouin *et al.*, 1992; Blouin *et al.*, 1995; Braisher *et al.*, 2004), e incluso con parásitos que tienen un ciclo biológico predispuesto a la reinfección como *S. ratti* (Paterson *et al.*, 2000). La hipótesis más probable que explique este resultado son unas tasas de flujo génico relativamente elevadas que contribuyen a aumentar el tamaño efectivo de población. En este sentido, cabe destacar que el grado de divergencia genética entre las poblaciones bovinas de *F. hepatica* no estuvo correlacionado con la distancia geográfica entre las granjas, lo cual podría estar relacionado, precisamente, con altas tasas de flujo génico causadas por influencia humana, ya sea por el uso común de forraje almacenado como alimento o el movimiento del ganado por razones comerciales.

En definitiva, los resultados del presente estudio sugieren fuertemente diferencias en la estructura genética poblacional de *F. hepatica*, dependiendo de si parasita a vacas u ovejas. Como se ha venido discutiendo, evidencias de distinto tipo apuntan a un grado variable de flujo génico interpoblacional en la génesis de tales diferencias. Sin embargo, las diferencias en tamaño efectivo parecen ser, en último término, las responsables de un patrón más estructurado en las infrapoblaciones de ovejas. Así, las supuestas diferencias en las tasas de flujo génico no vienen más que a incrementar la disparidad de las poblaciones, en lo que a sensibilidad a la deriva se refiere. De hecho, son varios los factores, además del menor flujo génico, que podrían intervenir en concierto y explicar un tamaño efectivo sustancialmente menor de las poblaciones del parásito en ovejas. Por ejemplo, la mayor probabilidad de cruzamiento entre individuos clonales dentro del hospedador definitivo y, muy especialmente, la menor carga parasitaria que caracteriza al animal ovino, lo que quizás represente una mayor subdivisión de la población en grupos reproductivos. Por otro lado, si la supervivencia y la transmisión del parásito estuviesen de alguna manera correlacionadas, cosa muy probable si se tiene en cuenta la escasa capacidad de dispersión de las larvas y la contingencia asociada al éxito en la transmisión (v. g., el hospedador apropiado ha de estar disponible), la transmisión agregada, de especial importancia en el caso de las ovejas debido al menor grado de mezcla de la población parasitaria, podría exacerbar el éxito reproductivo de algunas infrapoblaciones con respecto a otras, disminuyendo considerablemente el tamaño efectivo de población (Criscione y Blouin, 2005).

IMPLICACIONES PARA LA RESISTENCIA FRENTE A ANTIHELMÍNTICOS

Las diferencias en estructura genética poblacional, que se derivan de la interpretación de los resultados, tienen implicaciones para la resistencia frente a antihelmínticos en base a dos aspectos fundamentales. En primer lugar, las presuntas diferencias en tamaño efectivo conllevan efectos de deriva variables, que en algunos casos pueden llegar a eclipsar el efecto de la selección incluso con coeficientes de selección muy elevados, como se esperan en un escenario de fuerte presión selectiva impuesta por el tratamiento antihelmíntico. En segundo lugar, las diferencias en flujo génico introducen variación en las posibilidades de diseminación de mutaciones favorables, pero también afectan al proceso de

adaptación local. A continuación, desarrollaremos estas ideas en relación con la situación planteada por *F. hepatica* en el contexto geográfico estudiado.

El hecho de que las poblaciones de *F. hepatica* puedan diferir en el tamaño efectivo de población en función de la especie hospedadora, debido a diferencias en la dinámica de transmisión, tiene importantes implicaciones en una eventual evolución de la resistencia frente a fármacos antihelmínticos. Teóricamente, si la población tiene un tamaño efectivo grande, es previsible que la selección natural sea más eficiente a la hora de incrementar la frecuencia de una mutación favorable, especialmente si esta es dominante, ya que la fluctuación aleatoria en su frecuencia alélica asociada a un tamaño de población finito será menor. En otras palabras, ya que la muestra en la población de gametos en una generación es relativamente grande, el “error de muestreo” cometido en la siguiente generación a la hora de reproducir la variabilidad genética de la población es menor. Esta deriva en las frecuencias alélicas atribuible al azar, cuya magnitud depende del tamaño efectivo de población, tiene un sentido impredecible, esto es, la frecuencia puede tanto aumentar como disminuir en cada generación, por lo que contrasta con el efecto determinista de la selección natural. Así, si en la población está presente una mutación favorable, digamos una variante alélica que confiere resistencia a una población que está siendo tratada con fármacos, la selección incrementará la frecuencia de dicha variante, pero este efecto puede verse eclipsado por la deriva genética cuando el tamaño efectivo es pequeño. En realidad, la probabilidad de que una mutación favorable se pierda en las primeras generaciones por deriva es muy alta incluso en poblaciones grandes, pues la frecuencia de la mutación es inicialmente muy pequeña y simplemente por azar termina por desembocar en familias de tamaño cero, individuos que no contribuyen con sus genes a la siguiente generación. Así, se ha demostrado que, bajo ciertas asunciones, la probabilidad de fijación de una mutación favorable es aproximadamente igual al doble del coeficiente de selección. Esto significa que para coeficientes altos, por ejemplo, que la mutación confiera a los heterocigotos una ventaja del 10 %, la probabilidad de fijación sería únicamente el 20 %. Pero si el tamaño efectivo es relativamente pequeño, la deriva genética prevalece sobre la selección y la probabilidad de fijación de una mutación favorable es aproximadamente la de una mutación neutral (Kimura, 1962). Evidentemente, si la mutación es dominante

superará antes el tamiz de Haldane, es decir, alcanzará una frecuencia suficiente para que la selección tenga la oportunidad de oponerse al efecto de deriva. En cualquier caso, con independencia de si la mutación es perjudicial o favorable, recesiva o dominante, existe una alta probabilidad de que una nueva mutación se pierda por azar en unas pocas generaciones debido a que su frecuencia inicial es muy baja (Hedrick, 2009). Asumiendo HWE, una nueva mutación va estar presente casi exclusivamente en heterocigotos, de ahí que la ventaja selectiva solo se manifestaría en caso de que exista dominancia o aditividad (para el caso de un locus con dos alelos, que el heterocigoto manifieste un fenotipo intermedio entre ambos homocigotos). Se ha argumentado que las mutaciones que confieren resistencia a fármacos en helmintos parásitos son generalmente recesivas (Cornell *et al.*, 2003), por lo que frecuentemente se perderían por deriva genética antes de que alcanzasen una frecuencia lo suficientemente elevada como para encontrarlas en un número significativo de homocigotos. Puesto que la consanguinidad aumenta la homocigosis, es razonable esperar que el fenómeno de la resistencia sea particularmente común en poblaciones con tamaño efectivo grande en las que estén interviniendo mecanismos que aumenten los índices de consanguinidad (Cornell *et al.*, 2003; Conner y Hartl, 2004). Según esto, si las mutaciones que confieren resistencia al TCBZ en *F. hepatica* fuesen recesivas, el incremento de su frecuencia por selección direccional en las poblaciones del área de estudio podría estar favorecido en ambas especies hospedadoras por, al menos, dos razones diferentes. Por un lado, las poblaciones que parasitan al ganado bovino podrían desarrollar resistencia con mayor probabilidad porque albergan mayor diversidad genética y probablemente poseen un mayor tamaño efectivo en comparación con las duelas de ovejas. Por otro lado, la resistencia podría verse favorecida en las infrapoblaciones de ovejas debido a que presentan un mayor potencial para la consanguinidad. La presencia de clones es particularmente frecuente en este hospedador, lo cual aumenta las posibilidades de apareamiento entre individuos genéticamente idénticos, y de esta manera conduce a una mayor frecuencia de homocigotos en la población. Este incremento de la homocigosis reduciría la probabilidad de que nuevas mutaciones favorables recesivas se perdiesen por deriva genética, resultando más probable su acumulación en las poblaciones. No obstante, el tamaño efectivo relativamente elevado de las

poblaciones de *F. hepatica* en el ganado bovino proporcionaría un escenario especialmente favorable para el desarrollo de la resistencia, si algún otro factor incrementase los índices de consanguinidad. Por ejemplo, la existencia de focos de transmisión independientes, a pesar de un flujo génico elevado, puede incrementar la homocigosis debido a consanguinidad local. Un modelo de transmisión focal de este tipo se ha observado recientemente en otro helminto parásito, *Ascaris lumbricoides*, cuyas poblaciones muestran a menudo un alto flujo génico (Criscione *et al.*, 2010).

Respecto a las diferencias en las tasas de flujo génico detectadas en *F. hepatica* de vacas y ovejas, existen también implicaciones potenciales para la resistencia frente a fármacos antihelmínticos, pues este factor contribuye a aumentar el tamaño efectivo, favorece la propagación de alelos raros, incluyendo aquellos que confieren resistencia a fármacos, pero igualmente puede ralentizar el efecto de la selección cuando es cuantioso el flujo de genes desde poblaciones que no están siendo sometidas a las mismas presiones selectivas. En el caso particular de las explotaciones gallegas de ganado bovino, el riesgo de desarrollo y diseminación de resistencias es alto cuando se considera la costumbre generalizada de tratar a los animales con TCBZ, a menudo sin responder a un diagnóstico previo (Mezo *et al.*, 2008). Esto implicaría que son múltiples las poblaciones sometidas a una fuerte presión de selección, haciendo más probable no solo la emergencia de la mutación (por supuesto, con carácter preadaptativo) sino también su diseminación.

CONCLUSIONES

1. Las poblaciones geográficas de *F. hepatica* estudiadas se caracterizan por tener niveles de variabilidad genética relativamente elevados, pero también por manifestar importantes déficits de heterocigotos probablemente relacionados con subdivisión críptica a nivel infrapoblacional, particularmente en el caso del ganado bovino.

2. El impacto de la reproducción clonal sobre la variabilidad genética de los grupos reproductivos que van a dar lugar a la siguiente generación del parásito es notablemente mayor en el caso de las ovejas que en el de las vacas, debido a la desigual presencia de clones. La conformación de las infrapoblaciones en el hospedador definitivo está determinada por la transmisión agregada en las ovejas y por mayores tasas de flujo génico en las vacas.

3. Las poblaciones de *F. hepatica* estudiadas son predominantemente panmícticas, siendo la fecundación cruzada el principal modo de reproducción de este parásito.

4. Los parásitos de las ovejas muestran, en general, menor variabilidad genética y un grado de divergencia considerablemente mayor a nivel infrapoblacional que en el caso de las vacas. Esto sugiere tamaños efectivos de población más pequeños y menores tasas de flujo génico en el caso de las ovejas, lo cual es coherente con diferencias en el manejo del ganado ovino y bovino.

5. La ausencia de correlación entre las distancias genéticas interpoblacionales y la distancia geográfica entre granjas, sugiere la mezcla de parásitos de orígenes diversos en cada vaca y es coherente con la hipótesis de mayor tamaño efectivo y grado de flujo génico en las poblaciones que parasitan al ganado bovino.

6. Por razones distintas, mayor tamaño efectivo de las poblaciones que parasitan a vacas y mayor potencial para la consanguinidad en los parásitos de ovejas, la estructura genética poblacional de *F. hepatica* favorece el desarrollo de fenotipos resistentes frente a antihelmínticos en el contexto geográfico estudiado.

7. Las condiciones más propicias para la aparición del fenómeno de la resistencia son: grandes poblaciones parasitarias en explotaciones de ganado bovino profusamente tratadas y que estén sometidas a procesos que aumenten la frecuencia de homocigotos. Por ejemplo, la exposición periódica del ganado a focos de infección que favorezcan la reproducción sexual del parásito entre individuos genéticamente emparentados.

ANEXO

Tabla 1. Continuación.

		ABG	BOV2	CHAN	COL	MES	CER	MEL	CCD	GUN	BOV1	MBO
<i>Hk</i>	<i>N</i>	36	45	37	32	31	48	36	49	53	43	96
	<i>AR</i>	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	101	0,931	0,756	0,824	0,641	0,742	0,698	0,806	0,847	0,802	0,767	0,682
	102	0,069	0,244	0,176	0,359	0,258	0,302	0,194	0,153	0,198	0,233	0,318
	<i>H_e</i>	0,131	0,373	0,294	0,468	0,389	0,426	0,318	0,262	0,321	0,361	0,436
	<i>H_o</i>	0,083	0,356	0,243	0,406	0,258	0,312	0,222	0,265	0,207	0,279	0,385
<i>Idh</i>	<i>N</i>	36	45	37	32	32	48	37	49	53	43	96
	<i>AR</i>	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	101	0,167	0,222	0,081	0,156	0,266	0,198	0,203	0,306	0,104	0,174	0,172
	102	0,833	0,778	0,919	0,844	0,734	0,802	0,797	0,694	0,896	0,826	0,828
	<i>H_e</i>	0,282	0,350	0,151	0,268	0,396	0,321	0,328	0,429	0,188	0,291	0,286
	<i>H_o</i>	0,278	0,400	0,162	0,312	0,281	0,312	0,351	0,490	0,170	0,349	0,302
<i>Pgd</i>	<i>N</i>	36	43	34	33	28	48	37	47	51	42	96
	<i>AR</i>	2,95	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,88
	101	0,667	0,488	0,441	0,621	0,464	0,302	-	-	-	-	0,031
	102	0,305	0,512	0,559	0,379	0,536	0,698	0,324	0,489	0,578	0,488	0,458
	103	0,028	-	-	-	-	-	0,676	0,511	0,422	0,512	0,511
	<i>H_e</i>	0,468	0,506	0,500	0,478	0,506	0,426	0,444	0,505	0,492	0,506	0,531
	<i>H_o</i>	0,500	0,419	0,529	0,333	0,357	0,396	0,486	0,468	0,569	0,500	0,437

Tabla 1. Continuación.

		ABG	BOV2	CHAN	COL	MES	CER	MEL	CCD	GUN	BOV1	MBO
<i>Pgm-2</i>	<i>N</i>	36	45	37	31	32	48	37	47	53	43	98
	<i>AR</i>	3,00	3,62	2,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	2,99	3,00
	101	0,292	0,322	0,595	0,177	0,281	0,219	0,419	0,447	0,396	0,523	0,444
	102	0,139	0,089	-	0,194	0,047	0,167	0,230	0,181	0,179	0,047	0,204
	103	0,569	0,578	0,405	0,629	0,672	0,614	0,351	0,372	0,425	0,430	0,352
	104	-	0,011	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>H_e</i>	0,479	0,560	0,489	0,544	0,475	0,552	0,657	0,636	0,637	0,545	0,641
	<i>H_o</i>	0,083	0,044	0,000	0,032	0,094	0,146	0,162	0,106	0,170	0,395	0,224
<i>Pgm-1</i>	<i>N</i>	36	45	37	33	32	48	37	49	53	43	98
	<i>AR</i>	1,95	1,95	1,76	2,00	2,00	1,99	1,76	1,57	1,00	1,65	1,29
	101	0,972	0,967	0,986	0,924	0,891	0,948	0,986	0,990	1,000	0,988	0,995
	102	0,028	0,033	0,014	0,076	0,109	0,052	0,014	0,010	-	0,012	0,005
	<i>H_e</i>	0,055	0,065	0,027	0,142	0,198	0,100	0,027	0,020	0,000	0,023	0,010
	<i>H_o</i>	0,056	0,067	0,027	0,091	0,219	0,104	0,027	0,020	0,000	0,023	0,010
<i>FH15</i>	<i>N</i>	36	45	37	32	31	48	37	48	53	43	97
	<i>AR</i>	2,95	4,10	5,50	4,85	3,90	5,77	3,51	4,16	4,42	3,65	4,75
	228	-	-	0,041	-	-	-	-	-	-	-	0,010
	230	-	0,089	0,068	0,078	0,113	0,104	0,095	0,125	0,076	0,058	0,057
	232	0,875	0,867	0,797	0,844	0,823	0,708	0,878	0,792	0,802	0,849	0,881
	234	0,097	0,022	0,013	0,031	-	0,083	-	0,063	0,028	0,081	0,010
	236	-	-	-	0,031	0,048	0,042	-	-	-	-	0,010
	238	0,028	0,011	0,013	-	-	0,042	-	-	-	-	0,016
	240	-	0,011	0,068	0,016	-	-	0,014	0,010	-	-	0,016
	242	-	-	-	-	0,016	-	0,013	0,010	0,009	-	-
	248	-	-	-	-	-	-	-	-	0,085	-	-
	256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,012	-
	260	-	-	-	-	-	0,021	-	-	-	-	-
<i>H_e</i>		0,227	0,243	0,358	0,284	0,313	0,482	0,222	0,357	0,346	0,272	0,220
	<i>H_o</i>	0,083	0,089	0,270	0,094	0,258	0,167	0,054	0,167	0,151	0,186	0,103

Tabla 1. Continuación.

		ABG	BOV2	CHAN	COL	MES	CER	MEL	CCD	GUN	BOV1	MBO
<i>FH222CBP</i>	<i>N</i>	36	45	37	32	32	48	37	47	53	40	98
	<i>AR</i>	9,75	11,35	11,38	10,48	9,72	9,93	8,21	9,35	11,35	13,09	7,49
	143	-	-	-	-	0,016	0,010	-	0,011	-	0,013	-
	145	-	-	-	-	-	0,031	-	-	0,019	-	-
	147	0,042	-	0,054	0,109	0,016	0,136	0,014	0,011	0,057	0,013	0,005
	149	-	-	0,027	-	-	-	-	-	-	-	-
	151	-	-	-	-	-	-	-	-	0,009	-	-
	153	0,014	-	-	-	-	-	-	0,042	-	0,013	-
	155	-	0,033	-	0,016	-	-	-	-	0,028	0,037	-
	157	0,055	0,056	0,108	0,047	0,109	0,115	0,013	0,064	0,076	0,075	0,041
	159	0,194	0,100	0,095	0,234	0,156	0,094	0,189	0,128	0,245	0,125	0,133
	161	0,097	0,311	0,324	0,344	0,375	0,125	0,311	0,223	0,292	0,187	0,204
	163	0,167	0,111	0,135	0,109	0,156	0,240	0,095	0,223	0,076	0,125	0,424
	165	0,194	0,122	0,081	0,031	0,031	0,083	0,216	0,223	0,104	0,150	0,066
	167	0,153	0,089	0,081	0,062	0,047	0,135	0,122	0,053	0,038	0,112	0,097
	169	0,042	0,067	0,027	0,016	0,031	0,021	0,027	0,011	0,019	0,087	0,015
	171	0,042	0,033	0,014	-	0,063	0,010	-	-	0,028	0,025	-
	173	-	0,045	0,041	0,016	-	-	-	-	0,009	0,013	0,015
	175	-	0,022	-	-	-	-	0,013	-	-	0,013	-
	177	-	0,011	0,013	-	-	-	-	0,011	-	-	-
	179	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,013	-
	181	-	-	-	0,016	-	-	-	-	-	-	-
	<i>H_e</i>	0,867	0,855	0,848	0,807	0,803	0,869	0,807	0,834	0,833	0,893	0,749
	<i>H_o</i>	0,889	0,889	0,784	0,812	0,781	0,854	0,811	0,894	0,811	0,950	0,653

Tabla 1. Continuación.

		ABG	BOV2	CHAN	COL	MES	CER	MEL	CCD	GUN	BOV1	MBO
FH23	N	31	42	29	28	28	42	35	39	49	36	87
	AR	5,90	5,56	3,00	3,00	5,00	4,78	5,56	5,00	6,98	5,00	4,33
	275	0,016	-	-	-	0,036	0,131	0,014	-	0,021	0,056	0,012
	277	0,274	0,143	0,414	0,196	0,179	0,166	0,157	0,308	0,235	0,180	0,299
	279	0,339	0,643	0,448	0,625	0,589	0,655	0,429	0,384	0,602	0,528	0,379
	281	0,048	0,095	-	-	-	-	-	0,128	0,041	0,111	0,023
	283	0,081	-	-	-	-	-	0,029	-	0,010	-	-
	285	-	0,012	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	297	-	-	-	-	0,071	-	0,014	-	0,020	-	-
	299	0,242	0,083	0,138	0,179	0,125	0,024	0,357	0,103	0,051	0,125	0,287
	301	-	0,024	-	-	-	0,024	-	0,077	-	-	-
	321	-	-	-	-	-	-	-	-	0,020	-	-
	H _e	0,755	0,556	0,619	0,549	0,610	0,532	0,672	0,734	0,583	0,667	0,687
FH25	H _o	0,355	0,238	0,172	0,286	0,107	0,214	0,486	0,359	0,429	0,417	0,218
	N	36	45	37	33	32	48	37	49	53	43	98
	AR	3,00	4,24	3,00	3,85	4,73	3,83	3,00	2,92	2,98	3,00	4,53
	276	-	0,011	-	0,015	0,016	0,021	-	-	-	-	0,051
	278	0,139	0,211	0,135	0,227	0,031	0,104	0,108	0,031	0,160	0,140	0,245
	280	0,778	0,678	0,770	0,667	0,890	0,729	0,757	0,775	0,793	0,767	0,617
	282	0,083	0,089	0,095	0,091	0,047	0,146	0,135	0,194	0,047	0,093	0,077
	284	-	0,011	-	-	0,016	-	-	-	-	-	-
	286	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005
	288	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005
	H _e	0,374	0,493	0,385	0,503	0,206	0,440	0,403	0,364	0,347	0,387	0,553
	H _o	0,306	0,533	0,432	0,545	0,187	0,250	0,432	0,408	0,340	0,349	0,449

Tabla 2. Tamaño de muestra (N), riqueza alélica (AR), frecuencias alélicas y heterocigosis esperada (H_e) y observada (H_o) para 10 infrapoblaciones de *Fasciola hepatica* en ganado ovino. Los datos fueron calculados después de reducir todos los grupos estadísticamente significativos de MLGs idénticos a un único ejemplar en cada muestra. Se incluyen los genotipos en los que faltan datos (MLGs incompletos).

		MBO1	MBO2	MBO3	MBO4	MBO5	MBO6	MBO7	MBO8	MBO9	MBO10
Aco	N	11	5	10	8	11	16	6	11	14	5
	AR	1,00	1,00	1,00	1,50	1,36	1,70	1,67	1,00	1,90	1,98
	101	1,000	1,000	1,000	0,937	0,955	0,875	0,917	1,000	0,786	0,800
	102	-	-	-	0,063	0,045	0,125	0,083	-	0,214	0,200
	H_e	0,000	0,000	0,000	0,125	0,091	0,226	0,167	0,000	0,349	0,356
	H_o	0,000	0,000	0,000	0,125	0,091	0,125	0,167	0,000	0,143	0,400
Ak	N	11	5	10	8	11	17	6	11	14	5
	AR	1,61	2,00	2,00	1,99	1,61	1,94	1,91	1,92	1,99	1,98
	101	0,909	0,700	0,550	0,687	0,909	0,735	0,833	0,773	0,643	0,800
	102	0,091	0,300	0,450	0,313	0,091	0,265	0,167	0,227	0,357	0,200
	H_e	0,173	0,467	0,521	0,458	0,173	0,401	0,303	0,368	0,476	0,356
	H_o	0,000	0,600	0,300	0,125	0,182	0,412	0,333	0,273	0,571	0,400
Got-1	N	11	5	10	8	11	17	6	11	12	5
	AR	1,76	2,00	1,65	1,90	1,61	1,83	1,00	1,61	1,33	1,80
	101	0,136	0,300	0,100	0,187	0,091	0,176	-	0,091	0,042	0,100
	102	0,864	0,700	0,900	0,813	0,909	0,824	1,000	0,909	0,958	0,900
	H_e	0,247	0,467	0,189	0,325	0,173	0,299	0,000	0,173	0,083	0,200
	H_o	0,273	0,600	0,200	0,375	0,182	0,353	0,000	0,182	0,083	0,200

Tabla 2. Continuación.

		MBO1	MBO2	MBO3	MBO4	MBO5	MBO6	MBO7	MBO8	MBO9	MBO10
<i>Hk</i>	<i>N</i>	11	5	10	8	11	17	5	10	14	5
	<i>AR</i>	2,00	1,00	2,00	1,99	1,00	1,99	1,98	1,95	1,99	2,00
	101	0,545	1,000	0,400	0,687	1,000	0,618	0,800	0,750	0,607	0,700
	102	0,455	-	0,600	0,313	-	0,382	0,200	0,250	0,393	0,300
	<i>H_e</i>	0,519	0,000	0,505	0,458	0,000	0,487	0,356	0,395	0,495	0,467
	<i>H_o</i>	0,545	0,000	0,600	0,125	0,000	0,529	0,400	0,300	0,500	0,600
<i>Idh</i>	<i>N</i>	9	5	10	8	11	17	6	11	14	5
	<i>AR</i>	1,85	1,80	1,90	1,77	1,76	1,42	1,98	2,00	1,76	1,98
	101	0,167	0,100	0,200	0,125	0,136	0,059	0,250	0,409	0,143	0,200
	102	0,833	0,900	0,800	0,875	0,864	0,941	0,750	0,591	0,857	0,800
	<i>H_e</i>	0,294	0,200	0,337	0,233	0,247	0,114	0,409	0,506	0,254	0,356
	<i>H_o</i>	0,333	0,200	0,400	0,250	0,091	0,118	0,167	0,818	0,286	0,400
<i>Pgd</i>	<i>N</i>	11	5	9	8	11	17	6	11	13	5
	<i>AR</i>	1,76	2,00	2,69	2,00	2,63	1,97	2,00	1,76	2,00	1,80
	101	-	-	0,111	-	0,182	-	-	-	-	-
	102	0,864	0,400	0,333	0,625	0,136	0,324	0,333	0,864	0,423	0,100
	103	0,136	0,600	0,556	0,375	0,682	0,676	0,667	0,136	0,577	0,900
	<i>H_e</i>	0,247	0,533	0,601	0,500	0,506	0,451	0,485	0,247	0,508	0,200
	<i>H_o</i>	0,273	0,400	0,667	0,500	0,636	0,647	0,333	0,091	0,385	0,200

Tabla 2. Continuación.

		MBO1	MBO2	MBO3	MBO4	MBO5	MBO6	MBO7	MBO8	MBO9	MBO10
<i>Pgm-2</i>	<i>N</i>	11	5	10	8	11	17	6	11	14	5
	<i>AR</i>	2,47	2,00	2,85	2,27	2,84	2,21	2,91	2,85	2,61	2,00
	101	0,091	0,300	0,550	0,125	0,500	0,647	0,417	0,364	0,607	0,600
	102	0,727	-	0,200	0,062	0,182	0,029	0,166	0,182	0,286	-
	103	0,182	0,700	0,250	0,813	0,318	0,324	0,417	0,454	0,107	0,400
	<i>H_e</i>	0,450	0,467	0,626	0,342	0,645	0,490	0,682	0,658	0,558	0,533
	<i>H_o</i>	0,000	0,200	0,100	0,125	0,273	0,353	0,500	0,364	0,071	0,400
<i>Pgm-1</i>	<i>N</i>	11	5	10	8	11	17	6	11	14	5
	<i>AR</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,36	1,00	1,00
	101	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,955	1,000	1,000
	102	-	-	-	-	-	-	-	0,045	-	-
	<i>H_e</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,091	0,000	0,000
	<i>H_o</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,091	0,000	0,000
<i>FH15</i>	<i>N</i>	11	5	10	8	10	17	6	11	14	5
	<i>AR</i>	1,00	1,80	4,07	2,00	1,00	1,66	1,00	1,86	1,78	1,00
	228	-	-	0,050	0,062	-	-	-	-	-	-
	230	-	-	0,100	0,063	-	0,059	-	0,182	0,071	-
	232	1,000	0,900	0,500	0,875	1,000	0,912	1,000	0,818	0,893	1,000
	234	-	0,100	-	-	-	0,029	-	-	-	-
	236	-	-	0,050	-	-	-	-	-	0,036	-
	238	-	-	0,150	-	-	-	-	-	-	-
	240	-	-	0,150	-	-	-	-	-	-	-
	<i>H_e</i>	0,000	0,200	0,726	0,242	0,000	0,169	0,000	0,312	0,204	0,000
	<i>H_o</i>	0,000	0,200	0,500	0,125	0,000	0,059	0,000	0,000	0,143	0,000

Tabla 2. Continuación.

		MBO1	MBO2	MBO3	MBO4	MBO5	MBO6	MBO7	MBO8	MBO9	MBO10
FH222CBP	N	11	5	10	8	11	17	6	11	14	5
	AR	2,23	3,96	3,65	5,29	4,07	3,95	4,39	2,89	4,51	3,40
	147	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,100
	157	-	0,300	-	0,062	0,045	-	0,166	-	0,036	-
	159	-	-	0,150	0,188	0,091	0,147	0,083	0,227	0,250	-
	161	0,182	0,300	0,250	0,125	0,091	0,294	0,167	0,091	0,107	0,700
	163	0,773	0,200	0,400	0,250	0,546	0,353	0,417	0,636	0,286	0,100
	165	-	-	0,200	0,188	0,045	0,118	-	-	0,036	-
	167	0,045	0,200	-	0,125	0,046	0,088	0,167	0,046	0,214	0,100
	169	-	-	-	-	0,136	-	-	-	-	-
	173	-	-	-	0,062	-	-	-	-	0,071	-
FH23	H _e	0,385	0,822	0,753	0,883	0,693	0,768	0,803	0,558	0,820	0,533
	H _o	0,182	0,400	0,800	1,000	0,636	0,765	0,833	0,273	1,000	0,400
	N	10	4	8	4	10	17	5	10	14	5
	AR	1,90	3,00	1,77	3,00	2,55	2,67	3,00	2,70	3,47	1,98
	275	-	-	-	-	-	-	-	0,050	0,036	-
	277	0,200	0,625	0,125	0,125	0,200	0,117	0,300	0,700	0,250	0,800
	279	0,800	0,250	0,875	0,375	-	0,471	0,300	0,050	0,321	0,200
	281	-	0,125	-	-	0,100	-	-	-	0,036	-
	299	-	-	-	0,500	0,700	0,412	0,400	0,200	0,357	-
	H _e	0,337	0,607	0,233	0,679	0,484	0,613	0,733	0,489	0,730	0,356
	H _o	0,000	0,250	0,000	0,250	0,000	0,235	0,800	0,200	0,500	0,000

Tabla 2. Continuación.

		MBO1	MBO2	MBO3	MBO4	MBO5	MBO6	MBO7	MBO8	MBO9	MBO10
FH25	N	11	5	10	8	11	17	6	11	14	5
	AR	3,32	1,80	2,35	2,73	2,69	2,77	2,33	1,97	3,03	2,78
	276	-	-	-	0,250	-	0,088	-	0,091	0,036	-
	278	0,409	0,100	0,250	0,125	0,227	0,324	0,083	-	0,464	0,100
	280	0,409	0,900	0,700	0,625	0,637	0,559	0,834	0,864	0,357	0,700
	282	0,091	-	0,050	-	0,136	0,029	0,083	0,045	0,143	0,200
	286	0,046	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	288	0,045	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H _e	0,684	0,200	0,468	0,567	0,550	0,592	0,318	0,255	0,659	0,511
	H _o	0,909	0,200	0,600	0,625	0,636	0,294	0,333	0,273	0,214	0,400

BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard, J. E.; Krutovskii, V. K.; Strauss, H. S. 1998.** RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. *Heredity*, **81**: 69-78.
- Adlard, R. D.; Barker, S. C.; Blair, D.; Cribb, T. H. 1993.** Comparison of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) from populations and species of Fasciolidae (Digenea). *International Journal for Parasitology*, **23**: 422-425.
- Agatsuma, T.; Terasaki, K.; Yang, L.; Blair, D. 1994.** Genetic variation in the triploids of Japanese *Fasciola* species, and relationships with other species in the genus. *Journal of Helminthology*, **68**: 181-186.
- Alasaad, S.; Huang, C. Q.; Li, Q. Y.; Granados, J. E.; García-Romero, C.; Pérez, J. M.; Zhu, X. Q. 2007.** Characterization of *Fasciola* samples from different host species and geographical localities in Spain by sequences of internal transcribed spacers of rDNA. *Parasitology Research*, **101**: 1245-1250.
- Alasaad, S.; Li, Q. Y.; Lin, R. Q.; Martín-Atance, P.; Granados, J. E.; Díez-Baños, P.; Pérez, J. M.; Zhu, X. Q. 2008.** Genetic variability among *Fasciola hepatica* samples from different host species and geographical localities in Spain revealed by the novel SRAP marker. *Parasitology Research*, **103**: 181-186.
- Alcalá-Canto, Y.; Ibarra-Velarde, F.; Sumano-Lopez, H.; Gracia-Mora, J.; Alberti-Navarro, A. 2006.** Dose-response inhibition of proteolytic activity by a cysteine protease inhibitor in a murine model of fasciolosis. *Parasitology Research*, **98**: 438-442.
- Alcalá-Canto, Y.; Ibarra-Velarde, F.; Sumano-Lopez, H.; Gracia-Mora, J.; Alberti-Navarro, A. 2007.** Effect of a cysteine protease inhibitor on *Fasciola hepatica* (liver fluke) fecundity, egg viability, parasite burden, and size in experimentally infected sheep. *Parasitology Research*, **100**: 461-465.
- Álvarez, L.; Solana, H.; Mottier, L.; Virkel, G.; Fairweather, I.; Lanusse, C. 2005.** Altered drug influx/ efflux and enhanced activity in triclabendazole-resistant liver flukes. *Parasitology*, **131**: 501-510.

- Álvarez-Sánchez, M. A.; Mainer-Jaime, R. C.; Pérez-García, J.; Rojo-Vázquez, F. A. 2006.** Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Veterinary Record*, **159**: 424-425.
- Anderson, T. J. C.; Jaenike, J. 1997.** Host specificity, evolutionary relationships and macrogeographic differentiation among *Ascaris* populations from humans and pigs. *Parasitology*, **115**: 325-342.
- Anderson, T. J. C.; Romero-Abal, M. E.; Jaenike, J. 1993.** Genetic structure and epidemiology of *Ascaris* populations: patterns of host affiliation in Guatemala. *Parasitology*, **107**: 319-334.
- Anderson, T. J. C.; Romero-Abal, M. E.; Jaenike, J. 1995.** Mitochondrial DNA and *Ascaris* microepidemiology: the composition of parasite populations from individual hosts, families and villages. *Parasitology*, **110**: 221-229.
- Anderson, T. J. C.; Blouin, M. S.; Beech, R. N. 1998.** Population biology of parasitic nematodes: applications of genetic markers. *Advances in Parasitology*, **41**: 219-283.
- Anderson, T. J. C.; Haubold, B.; Williams, J. T.; Estrada-Franco, J. G.; Richardson, L.; Mollinedo, R.; Bockarie, M.; Mokili, J.; Mharakurwa, S.; French, N.; Whitworth, J.; Velez, I. D.; Brockman, A. H.; Nosten, F.; Ferreira, M. U.; Day, K. P. 2000.** Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular Biology and Evolution*, **17**: 1467-1482.
- Archie, E. A.; Luikart, G.; Ezenwa, V. O. 2009.** Infecting epidemiology with genetics: a new frontier in disease ecology. *Trends in Ecology and Evolution*, **24**: 21-30.
- Arnaud-Haond, S.; Belkhir, K. 2007.** GENCLONE: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Molecular Ecology Notes*, **7**: 15-17.
- Arnold, S. J.; Wade, M. J. 1984.** On the measurement of natural and sexual selection: Theory. *Evolution*, **38**: 709-719.

- Ashrafi, K.; Valero, M. A.; Massoud, J.; Sobhaini, A.; Solaymani-Mohammadi, S.; Conde, P.; Khoubbane, M.; Bargues, M. D.; Mas-Coma, S. 2006. Plant-borne human contamination by fascioliasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **75**: 295-302.
- Backeljau, T.; De Bruyn, L.; De Wolf, H.; Jordaens, K.; Van Dongen, S.; Verhagen, R.; Winnepenninckx, B. 1995. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods. *Cladistics*, **11**: 119-130.
- Ballard, J. W.; Whitlock, M. C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, **13**: 729-744.
- Balloux, F.; Lehmann, L.; De Meeûs, T. 2003. The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics*, **164**: 1635-1644.
- Barral, V.; Morand, S.; Pointier, J. P.; Théron, A. 1996. Distribution of schistosome genetic diversity within naturally infected *Rattus rattus* detected by RAPD markers. *Parasitology*, **113**: 511-517.
- Barrett, L. G.; Thrall, P. H.; Burdon, J. J.; Linde, C. C. 2008. Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host-parasite interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, **23**: 678-685.
- Belkhir, K.; Borsa, P.; Chikhi, L.; Raufaste, N.; Bonhomme, F. 1996-2004. GENETIX 4.05, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université Montpellier II, Montpellier. France.
- Blanquer, A. 1990. Phylogeographie intraspecificque d'un poisson marin, le flet *Platichthys flesus* L. (Heterosomata). Polymorphisme des marqueurs nucleaires et mitochondriaux. Ph. D. thesis, Université de Montpellier, Montpellier. France.
- Blouin, M. S. 1998. Mitochondrial DNA diversity in nematodes. *Journal of Helminthology*, **72**: 285-289.

- Blouin, M. S.; Dame, J. B.; Tarrant, C. A.; Courtney, C. H. 1992.** Unusual population genetics of a parasitic nematode: mtDNA variation within and among populations. *Evolution*, **46**: 470-476.
- Blouin, M. S.; Yowell, C. A.; Courtney, C. H.; Dame, J. B. 1995.** Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics*, **141**: 1007-1014.
- Blouin, M. S.; Liu, J.; Berry, R. E. 1999.** Life cycle variation and the genetic structure of nematode populations. *Heredity*, **83**: 253-259.
- Boray, J. C.; Enigk, K. 1964.** Laboratory studies on the survival and infectivity of *Fasciola hepatica*- and *F. gigantica*-metacercariae. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie*, **15**: 324-331.
- Boray, J. C.; Crowfoot, P. D.; Strong, M. B.; Allison, J. R.; Schellenbaum, M.; Von Orelli, M.; Sarasin, G. 1983.** Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Veterinary Record*, **113**: 315-317.
- Borgsteede, F. H. M.; Hendriks, J.; Leeuw, W. A. 1994.** Winter survival of *Dictyocaulus viviparus* in the Netherlands. *Helminthologia*, **31**: 9-15.
- Braisher, T. L.; Gemmell, N. J.; Grenfell, B. T.; Amos, W. 2004.** Host isolation and patterns of genetic variability in three populations of *Teladorsagia* from sheep. *International Journal for Parasitology*, **34**: 1197-1204.
- Bush, A.O., Fernández, J. C.; Esch, G. W.; Seed, J.R. 2001.** *Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites*. Cambridge University Press, Cambridge. UK.
- Caillaud, D.; Prugnolle, F.; Durand, P.; Théron, A.; De Meeûs, T. 2006.** Host sex and parasite genetic diversity. *Microbes and Infection*, **8**: 2477-2483.
- Charlier, J.; Duchateau, L.; Claerebout, E.; Williams, D.; Vercruysse, J. 2007.** Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk

samples and production parameters in dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, **78**: 57-66.

Chevillon, C.; Koffi, B. B.; Barré, N.; Durand, P.; Arnathau, C.; De Meeûs, T. 2007. Direct and indirect inferences on parasite mating and gene transmission patterns. Pangamy in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Infection, Genetics and Evolution*, **7**: 298-304.

Churcher, T. S.; Schwab, A. E.; Prichard, R. K.; Basáñez, M. G. 2008. An analysis of genetic diversity and inbreeding in *Wuchereria bancrofti*: implications for the spread and detection of drug resistance. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **2**: e211.

Conder, G. A.; Campbell, W. C. 1995. Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance with special reference to drug resistance. *Advances in Parasitology*, **35**: 1-84.

Cornell, S. J.; Isham, V. S.; Smith, G.; Grenfell, B. T. 2003. Spatial parasite transmission, drug resistance, and the spread of rare genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**: 7401-7405.

Conner, J. K.; Hartl, D. L. 2004. *A Primer of Ecological Genetics*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.

Coustau, C.; Renaud, F.; Maillard, C.; Pasteur, N.; Delay, B. 1991. Differential susceptibility to a trematode parasite among genotypes of the *Mytilus edulis/galloprovincialis* complex. *Genetics Research*, **57**: 207-212.

Criscione, C. D.; Blouin, M. S. 2004. Life cycles shape parasite evolution: comparative population genetics of salmon trematodes. *Evolution*, **58**: 198-202.

Criscione, C. D.; Blouin, M. S. 2005. Effective sizes of macroparasite populations: a conceptual model. *Trends in Parasitology*, **21**: 212-217.

Criscione, C. D.; Blouin, M. S. 2006. Minimal selfing, few clones, and no among-host genetic structure in a hermaphroditic parasite with asexual larval propagation. *Evolution*, **60**: 553-562.

- Criscione, C. D.; Blouin, M. S. 2007.** Parasite phylogeographical congruence with salmon host evolutionarily significant units: implications for salmon conservation. *Molecular Ecology*, **16**: 993-1005.
- Criscione, C. D.; Poulin, R.; Blouin, M. S. 2005.** Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular Ecology*, **14**: 2247-2257.
- Criscione, C. D.; Cooper, B.; Blouin, M. S. 2006.** Parasite genotypes identify source populations of migratory fish more accurately than fish genotypes. *Ecology*, **87**: 823-828.
- Criscione, C. D.; Anderson, J. D.; Sudimack, D.; Subedi, J.; Upadhyay, R. P.; Jha, B.; Williams, K. D.; Williams-Blangero, S.; Anderson, T. J. C. 2010.** Landscape genetics reveals focal transmission of a human macroparasite. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **4**: e665.
- Criscione, C. D.; Vilas, R.; Paniagua, E.; Blouin, M. S. 2011.** More than meets the eye: detecting cryptic microgeographic population structure in a parasite with a complex life cycle. *Molecular Ecology*, **20**: 2510-2524.
- Dangprasert, T.; Khawsuk, W.; Meepool, A.; Wanichanon, C.; Viyanant, V.; Upatham, E.S.; Wongratanacheevin, S.; Sobhon, P. 2001.** *Fasciola gigantica*: surface topography of the adult tegument. *Journal of Helminthology*, **75**: 43-50.
- De Meeûs, T.; McCoy, K. D.; Prugnolle, F.; Chevillon, C.; Durand, P.; Hurtrez-Boussès, S.; Renaud, F. 2007.** Population genetics and molecular epidemiology or how to “débusquer la bête”. *Infection, Genetics and Evolution*, **7**: 308-332.
- Devine, C.; Brennan, G. P.; Lanusse, C. E.; Álvarez, L. I.; Trudgett, A.; Hoey, E.; Fairweather, I. 2009.** Effect of the metabolic inhibitor, methimazole on the drug susceptibility of a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, **136**: 183-192.

- Devine, C.; Brennan, G. P.; Lanusse, C. E.; Álvarez, L. I.; Trudgett, A.; Hoey, E.; Fairweather, I. 2010a. Inhibition of cytochrome P450-mediated metabolism enhances *ex vivo* susceptibility of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Parasitology*, **137**: 871-880.
- Devine, C.; Brennan, G. P.; Lanusse, C. E.; Álvarez, L. I.; Trudgett, A.; Hoey, E.; Fairweather, I. 2010b. Potentiation of triclabendazole sulfoxide-induced tegumental disruption by methimazole in a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, **106**: 1351-1363.
- Devine, C.; Brennan, G. P.; Lanusse, C. E.; Álvarez, L. I.; Trudgett, A.; Hoey, E.; Fairweather, I. 2010c. Enhancement of the drug susceptibility of a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica* using the metabolic inhibitor ketoconazole. *Parasitology Research*, **107**: 337-353.
- Devine, C.; Brennan, G. P.; Lanusse, C. E.; Álvarez, L. I.; Trudgett, A.; Hoey, E.; Fairweather, I. 2011a. Piperonyl butoxide enhances triclabendazole action against triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, **138**: 224-236.
- Devine, C.; Brennan, G. P.; Lanusse, C. E.; Álvarez, L. I.; Trudgett, A.; Hoey, E.; Fairweather, I. 2011b. Erratum to: inhibition of triclabendazole metabolism *in vitro* by ketoconazole increases disruption to the tegument of a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, **109**: 1209-1223.
- Devine, C.; Brennan, G. P.; Lanusse, C. E.; Álvarez, L. I.; Trudgett, A.; Hoey, E.; Fairweather, I. 2011c. Enhancement of triclabendazole action *in vivo* against a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica* by cotreatment with ketoconazole. *Veterinary Parasitology*, **177**: 305-315.
- Devine, C.; Brennan, G. P.; Lanusse, C. E.; Álvarez, L. I.; Trudgett, A.; Hoey, E.; Fairweather, I. 2012. Potentiation of triclabendazole action *in vivo* against a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica* following its co-administration with the metabolic inhibitor, ketoconazole. *Veterinary Parasitology*, **184**: 37-47.

- Dixon, K. E. 1966.** The physiology of excystment of the metacercaria of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology*, **56**: 431-456.
- Dobson, A. 2004.** Population dynamics of pathogens with multiple host species. *The American Naturalist*, **164**: S64-S78.
- Dosay-Akbulut, M.; Trudgett, A.; Stanhope, M. 2005.** Understanding genetic diversity of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **60**: 774-778.
- Dynes, C.; Fleming, C. C.; Murchie, A. K. 2001.** Genetic variation in native and introduced populations of the “New Zealand flatworm”, *Arthurdendyus triangulatus*. *Annals of Applied Biology*, **139**: 165-174.
- Elitok, B.; Mukaddes Elitok, Ö.; Kabu, M. 2006.** Field trial on comparative efficacy of four fasciolicides against natural liver fluke infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, **135**: 279-285.
- Ericson, L.; Burdon, J. J.; Müller, W. J. 1999.** Spatial and temporal dynamics of epidemics of the rust fungus *Uromyces valerianae* on populations of its host *Valeriana salina*. *Journal of Ecology*, **87**: 649-658.
- Esch, G. W.; Kennedy, C. R.; Bush, A. O.; Aho, J. M. 1988.** Patterns in helminth communities in freshwater fish in Great Britain: alternatives strategies for colonization. *Parasitology*, **96**: 519-532.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005.** Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**: 47-50.
- Fairweather, I. 2009.** Triclabendazole progress report, 2005-2009: an advancement of learning? *Journal of Helminthology*, **83**: 139-150.
- Fairweather, I. 2011.** Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy? *Veterinary Parasitology*, **180**: 133-143.

- Fairweather, I.; Boray, J. C. 1999.** Mechanisms of fasciolicide action and drug resistance in *Fasciola hepatica*. En: *Fasciolosis*. J. P. Dalton (Ed.). CABI Publishing, Wallingford. UK.
- Fairweather, I.; Meaney, M.; Savage, J.; Brennan, G.; Hoey, E.; Trudgett, A. 2008.** The role of drug efflux pumps in the development of resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica*. Xth European Multicolloquium of Parasitology (EMOP X), Paris. France.
- Fisher, M. C.; Viney, M. E. 1998.** The population genetic structure of the facultatively sexual parasitic nematode *Strongyloides ratti* in wild rats. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **265**: 703-709.
- Flanagan, A.; Edgar, H. W. J.; Gordon, A.; Hanna, R. E. B.; Brennan, G. P.; Fairweather, I. 2011.** Comparison of two assays, a faecal egg count reduction test (FECRT) and a coproantigen reduction test (CRT), for the diagnosis of resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology*, **176**: 170-176.
- Fletcher, H. L.; Hoey, E. M.; Orr, N.; Trudgett, A.; Fairweather, I.; Robinson, M. W. 2004.** The occurrence and significance of triploidy in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, **128**: 69-72.
- Francois, O.; Ancelet, S.; Guillot, G. 2006.** Bayesian clustering using hidden Markov random fields in spatial population genetics. *Genetics*, **174**: 805-816.
- Galtier, N.; Nabholz, B.; Glémin, S.; Hurst, G. D. D. 2009.** Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, **18**: 4541-4550.
- Ghisi, M.; Kaminsky, R.; Mäser, P. 2007.** Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Veterinary Parasitology*, **144**: 313-320.
- Goudet, J. 1995.** FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate *F*-statistics. *Journal of Heredity*, **86**: 485-486.

- Gower, C. M.; Webster, J. P. 2004.** Fitness of indirectly transmitted pathogens: restraint and constraint. *Evolution*, **58**: 1178-1184.
- Gregorius, H. R. 2005.** Testing for clonal propagation. *Heredity*, **94**: 173-179.
- Hanna, R. E. B.; Edgar, H. W. J.; McConnell, S.; Toner, E.; McConville, M.; Brennan, G. P.; Devine, C.; Flanagan, A.; Halferty, L.; Meaney, M.; Shaw, L.; Moffett, D.; McCoy, M.; Fairweather, I. 2010.** *Fasciola hepatica*: histological changes in the reproductive structures of triclabendazole (TCBZ)-sensitive and TCBZ-resistant flukes after treatment *in vivo* with TCBZ and the related benzimidazole derivative, Compound Alpha. *Veterinary Parasitology*, **168**: 240-254.
- Harris, H.; Hopkinson, D. A. 1976.** *Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics*. North-Holland Publishing Co., Amsterdam. The Netherlands.
- Hawdon, J. M.; Li, T.; Zhan, B.; Blouin, M. S. 2001.** Genetic structure of the human hookworm, *Necator americanus*, in China. *Molecular Ecology*, **10**: 1433-1437.
- Hebert, P. D. N.; Payne, W. J. 1985.** Genetic variation in populations of the hermaphroditic flatworm *Mesostoma lingua* (Turbellaria, Rhabdocoela). *The Biological Bulletin*, **169**: 143-151.
- Hedrick, P. W. 2009.** *Genetics of populations*. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts. USA.
- Herlich, H.; Rew, R. S.; Colglazier, M. L. 1981.** Inheritance of cambendazole resistance in *Haemonchus contortus*. *American Journal of Veterinary Research*, **42**: 1342-1344.
- Hodasi, J. K. M. 1971.** The output of cercariae of *Fasciola hepatica* by *Lymnaea truncatula* and the distribution of metacercariae on grass. *Parasitology*, **63**: 431-456.

- Höglund, J.; Morrison, D. A.; Mattsson, J. G.; Engström, A. 2006.** Population genetics of the bovine/cattle lungworm (*Dictyocaulus viviparus*) based on mtDNA and AFLP marker techniques. *Parasitology*, **133**: 89-99.
- Hugall, A.; Moritz, C.; Stanton, J.; Wolstenholme, D. R. 1994.** Low, but strongly structured mitochondrial DNA diversity in root knot nematodes (*Meloidogyne*). *Genetics*, **136**: 903-912.
- Hurtrez-Boussès, S.; Durand, P.; Jabbour-Zahab, R.; Guégan, J. F.; Meunier, C.; Bargues, M. D.; Mas-Coma, S.; Renaud, F. 2004.** Isolation and characterization of microsatellite markers in the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Molecular Ecology Notes*, **4**: 689-690.
- Huysse, T.; Poulin, R.; Théron, A. 2005.** Speciation in parasites: a population genetics approach. *Trends in Parasitology*, **21**: 469-475.
- Ibrahim, A. P.; Conway, D. J.; Hall, A.; Bundy, D. A. P. 1994.** Enzyme polymorphisms in *Ascaris lumbricoides* in Bangladesh. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **88**: 600-603.
- James, C. E.; Davey, M. W. 2009.** Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. *International Journal for Parasitology*, **39**: 213-220.
- Jobet, E.; Durand, P.; Langed, J.; Muller-Graf, C. D. M.; Hugot, J. P.; Bounoux, M. E.; Rivault, C.; Cloarec, A.; Morand, S. 2000.** Comparative genetic diversity of parasites and their hosts: population structure of an urban cockroach and its haploid-diploid parasite (oxyuroid nematode). *Molecular Ecology*, **9**: 481-486.
- Keeney, D. B.; Waters, J. M.; Poulin, R. 2007a.** Clonal diversity of the marine trematode *Maritrema novaezealandensis* within intermediate hosts: the molecular ecology of parasite life cycles. *Molecular Ecology*, **16**: 431-439.
- Keeney, D. B.; Waters, J. M.; Poulin, R. 2007b.** Diversity of trematode genetic clones within amphipods and the timing of same-clone infections. *International Journal for Parasitology*, **37**: 351-357.

- Keiser, J.; Utzinger, J.; Tanner, M.; Dong, Y.; Vennerstrom, J. L. 2006.** The synthetic peroxide OZ78 is effective against *Echinostoma caproni* and *Fasciola hepatica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **58**: 1193-1197.
- Keiser, J.; Shu-Hua, X.; Chollet, J.; Tanner, M.; Utzinger, J. 2007.** Evaluation of the *in vivo* activity of tribendimidine against *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*, *Clonorchis sinensis*, and *Opisthorchis viverrini*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **51**: 1096-1098.
- Kimura, M. 1962.** On the probability of fixation of mutant genes in a population. *Genetics*, **47**: 713-719.
- Koffi, B. B.; De Meeûs, T.; Barré, N.; Durand, P.; Arnathau, C.; Chevillon, C. 2006.** Founder effects, inbreeding and effective sizes in the Southern cattle tick: the effect of transmission dynamics and implications for pest management. *Molecular Ecology*, **15**: 4603-4611.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. 2004.** MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, **5**: 150-163.
- Kwa, M. S. G.; Veenstra, J. G.; Roos, M. H. 1994.** Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in β -tubulin isotype 1. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **63**: 299-303.
- Lacey, E. 1988.** The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology*, **18**: 885-936.
- Lajeunesse, M. J.; Forbes, M. R. 2002.** Host range and local parasite adaptation. *Proceedings Biological Sciences*, **269**: 703-710.
- Langella, O. 2002.** POPULATIONS 1.2.31. Logiciel de génétique de populations. Laboratoire populations, génétique et évolution, CNRS UPR 9034, Gif-sur-Yvette. France.

- Le Jambre, L. F.; Royal, W. M.; Martín, P. J. 1979.** The inheritance of thiabendazole resistance in *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, **78**: 107-119.
- Leignel, V., Humbert, J. F. 2001.** Mitochondrial DNA variation in benzimidazole-resistant and -susceptible populations of the small ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta*. *The Journal of heredity*, **92**: 503-506.
- Leung, T. L. F.; Poulin, R.; Keeney, D. B. 2009.** Accumulation of diverse parasite genotypes within the bivalve second intermediate host of the digenean *Gymnophallus* sp. *International Journal for Parasitology*, **39**: 327-331.
- Lifschitz, A.; Virkel, G.; Ballent, M.; Sallovitz, J.; Lanusse, C. 2009.** Combined use of ivermectin and triclabendazole in sheep: *in vitro* and *in vivo* characterization of their pharmacological interaction. *The Veterinary Journal*, **182**: 261-268.
- Lubega, G. W.; Prichard, R. K. 1991.** Interaction of benzimidazole anthelmintics with *Haemonchus contortus* tubulin: binding affinity and anthelmintic efficacy. *Experimental Parasitology*, **73**: 203-213.
- Luo, H. Y.; Nie, P.; Zhang, Y. A.; Yao, W. J. Wang, G. T. 2003.** Genetic differentiation in populations of the cestode *Bothriocephalus acheilognathi* (Cestoda, Pseudophyllidea) as revealed by eight microsatellite markers. *Parasitology*, **126**: 493-501.
- Lydeard, C.; Mulvey, M.; Aho, J. M.; Kennedy, P. K. 1989.** Genetic variability among natural populations of the liver fluke *Fascioloides magna* in the white-tailed deer, *Odocoileus virginianus*. *Canadian Journal of Zoology*, **67**: 2021-2025.
- Lymbery, A. J.; Constantine, C. C.; Thompson, R. C. A. 1997.** Self-fertilization without genomic or population structuring in a parasitic tapeworm. *Evolution*, **51**: 289-294.
- MacKenzie, K. 2002.** Parasites as biological tags in population studies of marine organisms: an update. *Parasitology*, **124**: S153-S163.

- MacKenzie, K.; Abaunza, P. 1998.** Parasites as biological tags for stock discrimination of marine fish: a guide to procedures and methods. *Fisheries Research*, **38**: 45-56.
- Manchenko, G. P. 1988.** Subunit structure of enzymes: allozymic data. *Isozyme Bulletin*, **21**: 144-159.
- Manchenko, G. P. 1994.** *Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*. CRC Press, Boca Raton, Florida. USA.
- Manel, S.; Berthier, P.; Luikart, G. 2002.** Detecting wildlife poaching: identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multilocus genotypes. *Conservation Biology*, **16**: 650-659.
- Manel, S.; Gaggiotti, O. E.; Waples, R. S. 2005.** Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology and Evolution*, **20**: 136-142.
- Mas-Coma, S.; Funatsu, I. R.; Bargues, M. D. 2001.** *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology*, **123**: S115-S127.
- Mas-Coma, S.; Bargues, M. D.; Valero, M. A. 2005.** Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*, **35**: 1255-1278.
- Mas-Coma, S.; Valero, M. A.; Bargues, M. D. 2009.** *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Advances in Parasitology*, **69**: 41-146.
- May, B. 1992.** Starch gel electrophoresis of allozymes. En: *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. A. R. Hoelzel (Ed.). Oxford University Press, New York. USA.
- May, R. M.; Woolhouse, M. E. J. 1993.** Biased sex-ratios and parasite mating probabilities. *Parasitology*, **107**: 287-295.

- McCoy, K. D.; Boulinier, T.; Tirard, C.; Michalakis, Y. 2001.** Host specificity of a generalist parasite: genetic evidence of sympatric host races in the seabird tick *Ixodes uriae*. *Journal of Evolutionary Biology*, **14**: 395-405.
- McCoy, K. D.; Boulinier, T.; Tirard, C.; Michalakis, Y. 2003a.** Host-dependent genetic structure of parasite populations: differential dispersal of seabird tick host races. *Evolution*, **57**: 288-296.
- McCoy, K. D.; Tirard, C.; Michalakis, Y. 2003b.** Spatial genetic structure of the ectoparasite *Ixodes uriae* within breeding cliffs of its colonial seabird host. *Heredity*, **91**: 422-429.
- McCoy, K. D., Boulinier, T.; Tirard, C. 2005.** Comparative host-parasite population structures: disentangling prospecting and dispersal in the Black-legged Kittiwake *Rissa tridactyla*. *Molecular Ecology*, **14**: 2825-2838.
- Meirmans, P. G. 2006.** Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, **60**: 2399-2402.
- Messerli, S. M.; Kasinathan, R. S.; Morgan, W.; Spranger, S.; Greenberg, R. M. 2009.** *Schistosoma mansoni* P-glycoprotein levels increase in response to praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel susceptibility. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **167**: 54-59.
- Mezo, M.; González-Warleta, M.; Castro-Hermida, J. A.; Ubeira, F. M. 2008.** Evaluation of the flukicide treatment policy for dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, **157**: 235-243.
- Miller, M. P. 1997.** RxC: a program for the analysis of contingency tables via Metropolis algorithm. Department of Biological Sciences. Northern Arizona University, Flagstaff 86011-5640. USA.
- Mitchell, G. B.; Maris, L.; Bonniwell, M. A. 1998.** Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Veterinary Record*, **143**: 399.

- Moll, L.; Gaasenbeek, C. P. H.; Vellema, P.; Borgsteede, F. H. M. 2000.** Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, **91**: 153-158.
- Mooney, L.; Good, B.; Hanrahan, J. P.; Mulcahy, G.; de Waal, T. 2009.** The comparative efficacy of four anthelmintics against a natural acquired *Fasciola hepatica* infection in hill sheep flock in the west of Ireland. *Veterinary Parasitology*, **164**: 201-205.
- Morand, S.; Müller-Graf, C. D. M. 2000.** Muscles or testes? Comparative evidence for sexual competition among dioecious blood parasites (Schistosomatidae) of vertebrates. *Parasitology*, **120**: 45-56.
- Morand, S.; Pointier, J. P.; Borel, G.; Théron, A. 1993.** Pairing probability of schistosomes related to their distribution among the host population. *Ecology*, **74**: 2444-2449.
- Morrondo Pelayo, P.; Sánchez Andrade, R.; Díez Baños, P.; Pérez Verdugo, L.; López Sández, C. 1994.** Dynamics of *Fasciola hepatica* eggs elimination and *Lymnaea truncatula* populations in cattle farms in Galicia (North-West Spain). *Research and Reviews in Parasitology*, **54**: 47-50.
- Mottier, L.; Virkel, G.; Solana, H.; Álvarez, L.; Salles, J.; Lanusse, C. E. 2004.** Triclabendazole biotransformation and comparative diffusion of the parent drug and its oxidised metabolites into *Fasciola hepatica*. *Xenobiotica*, **34**: 1043-1057.
- Mottier, L.; Álvarez, L.; Fairweather, I.; Lanusse, C. 2006.** Resistance-induced changes in triclabendazole transport in *Fasciola hepatica*: ivermectin reversal effect. *The Journal of Parasitology*, **92**: 1355-1360.
- Mulvey, M.; Aho, J. M.; Lydeard, C.; Leberg, P. L.; Smith, M. H. 1991.** Comparative population genetic structure of a parasite (*Fascioloides magna*) and its definitive host. *Evolution*, **45**: 1628-1640.
- Nadler, S. A. 1987.** Genetic variability in endoparasitic helminths. *Parasitology Today*, **3**: 154-155.

- Nadler, S. A. 1995.** Microevolution and the genetic structure of parasite populations. *The Journal of Parasitology*, **81**: 395-403.
- Nadler, S. A.; Hafner, M. S.; Hafner, J. C.; Hafner, D. J. 1990.** Genetic differentiation among chewing louse populations (Mallophaga: Trichodectidae) in a pocket gopher contact zone (Rodentia: Geomydiae). *Evolution*, **44**: 942-951.
- Nadler, S. A.; Lindquist, R. L.; Near, T. J. 1995.** Genetic structure of midwestern *Ascaris suum* populations: a comparison of isoenzyme and RAPD markers. *The Journal of Parasitology*, **81**: 385-394.
- Nei, M. 1987.** *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. USA.
- Nieberding, C. M.; Olivieri, I. 2007.** Parasites: proxies for host genealogy and ecology? *Trends in Ecology and Evolution*, **22**: 156-165.
- Nieberding, C.; Morand, S.; Libois, R.; Michaux, J. R. 2004.** A parasite reveals cryptic phylogeographic history of its host. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **271**: 2259-2568.
- Olaechea, F.; Lovera, V.; Larroza, M.; Raffo, F.; Cabrera, R. 2011.** Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Veterinary Parasitology*, **178**: 364-366.
- Overend, D. J.; Bowen, F. L. 1995.** Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Australian veterinary journal*, **72**: 275-276.
- Pasteur, N.; Pasteur, G.; Bonhomme, F.; Catalan, J.; Britton-Davidian, J. 1987.** *Manuel technique de génétique par électrophorèse de protéines*. Techniques et documentation (Lavoisier), Paris. France.
- Paterson, S.; Viney, M. E. 2000.** The interface between epidemiology and population genetics. *Parasitology Today*, **16**: 528-532.
- Paz-Silva, A.; Sánchez-Andrade, R.; Suárez, J. L.; Pedreira, J.; Arias, M.; López, C; Panadero, R.; Díaz, P.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P. 2003.**

- Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitology Research*, **91**: 328-331.
- Pongratz, N.; Gerace, L.; Michiels, N. K. 2002.** Genetic differentiation within and between populations of a hermaphroditic freshwater planarian. *Heredity*, **89**: 64-69.
- Poulin, R.; Keeney, D. B. 2008.** Host specificity under molecular and experimental scrutiny. *Trends in Parasitology*, **24**: 24-28.
- Price, P. W. 1977.** General concepts on the evolutionary biology of parasites. *Evolution*, **31**: 405-420.
- Price, P. W. 1980.** *Evolutionary biology of parasites*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. USA.
- Prichard, R. K. 2001.** Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends in Parasitology*, **17**: 445-453.
- Prichard, R. K.; Roulet, A. 2007.** ABC transporters and β -tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. *Parasitology*, **134**: 1123-1132.
- Prugnolle, F.; De Meeûs, T. 2008.** The impact of clonality on parasite population genetic structure. *Parasite*, **15**: 455-457.
- Prugnolle, F.; De Meeûs, T. 2010.** Apparent high recombination rates in clonal parasitic organisms due to inappropriate sampling design. *Heredity*, **104**: 135-140.
- Prugnolle, F.; De Meeûs, T.; Durand, P.; Sire, C.; Théron, A. 2002.** Sex-specific genetic structure in *Schistosoma mansoni*: evolutionary and epidemiological implications. *Molecular Ecology*, **11**: 1231-1238.
- Prugnolle, F.; Choisy, M.; Théron, A.; Durand, P.; De Meeûs, T. 2004.** Sex-specific correlation between heterozygosity and clone size in the trematode *Schistosoma mansoni*. *Molecular Ecology*, **13**: 2859-2864.

- Prugnolle, F.; Liu, H.; De Meeûs, T.; Balloux, F. 2005a.** Population genetics of complex life-cycle parasites: an illustration with trematodes. *International Journal for Parasitology*, **35**: 255-263.
- Prugnolle, F.; Roze, D.; Théron, A.; De Meeûs, T. 2005b.** *F*-statistics under alternation of sexual and asexual reproduction: a model and data from schistosomes (platyhelminth parasites). *Molecular Ecology*, **14**: 1355-1365.
- Prugnolle, F.; Théron, A.; Pierre Pointier, J.; Jabbour-Zahab, R.; Jarne, P.; Durand, P.; De Meeûs, T. 2005c.** Dispersal in a parasitic worm and its two hosts: consequence for local adaptation. *Evolution*, **59**: 296-303.
- Rauch, G.; Kalbe, M.; Reusch, T. B. H. 2005.** How a complex life cycle can improve a *parasite's sex* life. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**: 1069-1075.
- Raymond M.; Rousset, F. 1995.** GENEPOP (version 1.2): populations genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**: 248-249.
- Razakandrainibe, F. G.; Durand, P.; Koella, J. C.; De Meeûs, T.; Rousset, F.; Ayala, F. J.; Renaud, F. 2005.** "Clonal" population structure of the malaria agent *Plasmodium falciparum* in high-infection regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**: 17388-17393.
- Renaud, F. 1988.** Biologie et Evolution des Populations d'Helminthes Parasites: le Modèle Helminthes-Téléostéens. Thèse d'État, Université Montpellier II, Montpellier. France.
- Rice, W. R. 1989.** Analysing tables of statistical test. *Evolution*, **43**: 223-225.
- Richardson, B. J.; Baverstock, P. R.; Adams, M. 1986.** *Allozyme electrophoresis. A handbook for animal systematic and population studies.* Academic Press, Sydney. Australia.
- Robinson, M. W.; Trudgett, A.; Hoey, E. M.; Fairweather, I. 2002.** Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: β -tubulin and response to *in vitro* treatment with triclabendazole. *Parasitology*, **124**: 325-338.

- Robinson, M. W.; Lawson, J.; Trudgett, A.; Hoey, E. M.; Fairweather, I. 2004a.** The comparative metabolism of triclabendazole sulfoxide by triclabendazole-susceptible and triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, **92**: 205-210.
- Robinson, M. W.; McFerran, N.; Trudgett, A.; Hoey, E. M.; Fairweather, I. 2004b.** A possible model of benzimidazole binding to β -tubulin disclosed by invoking an interdomain movement. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **23**: 275-284.
- Robinson, M. W.; Tort, J. F.; Lowther, J.; Donnelly, S. M.; Wong, E.; Xu, W.; Stack, C. M.; Padula, M.; Herbert, B.; Dalton, J. P. 2008.** Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: expansion of a repertoire of virulence-associated factors. *Molecular and Cellular Proteomics*, **7**: 1111-1123.
- Rajo-Vázquez, F. A.; Ferre-Pérez, I. 1999.** Fasciolosis. En: *Parasitología Veterinaria*. M. Cordero del Campillo y F. A. Rajo-Vázquez (Eds.). McGraw Hill Interamericana, Madrid. España.
- Rondelaud, D.; Belfaiza, M.; Vignoles, P.; Moncef, M.; Dreyfuss, G. 2009.** Redial generations of *Fasciola hepatica*: a review. *Journal of Helminthology*, **83**: 245-254.
- Rousset, F. 2008.** Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**: 103-106.
- Ryan, L. A.; Hoey, E.; Trudgett, A.; Fairweather, I.; Fuchs, M.; Robinson, M. W.; Chambers, E.; Timson, D.; Ryan, E.; Fetwell, T.; Ivens, A.; Bentley, G.; Johnston, D. 2008.** *Fasciola hepatica* expresses multiple α - and β -tubulin isotypes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **159**: 73-78.
- Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N. 1985.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**: 1350-1354.

- Saitou, N.; Nei, M. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**: 406-425.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. 1989.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. USA.
- Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A.; Suárez, J.; Panadero, R.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P. 2000.** Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, **93**: 39-46.
- Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A.; Suárez, J. L.; Panadero, R.; Pedreira, J.; López, C.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P. 2002.** Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). *Veterinary Research Communications*, **26**: 361-370.
- Schweizer, G.; Braun, U.; Deplazes, P.; Torgerson, P. R. 2005.** Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Veterinary Record*, **157**: 188-193.
- Semyenova, S. K.; Morozova, E. V.; Chrisanfova, G. G.; Asatrian, A. M.; Movsessian, S. O.; Ryskov, A. P. 2003.** RAPD variability and genetic diversity in two populations of liver fluke *Fasciola hepatica*. *Acta Parasitologica*, **48**: 125-130.
- Semyenova, S. K.; Morozova, E. V.; Chrisanfova, G. G.; Gorokhov, V. V.; Arkhipov, I. A.; Moskvina, A. S.; Movsessyan, S. O.; Ryskov, A. P. 2006.** Genetic differentiation in eastern European and western Asian populations of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, as revealed by mitochondrial *nad1* and *cox1* genes. *The Journal of Parasitology*, **92**: 525-530.
- Sire, C.; Durand, P.; Pointier, J. P.; Théron, A. 2001.** Genetic diversity of *Schistosoma mansoni* within and among individual hosts (*Rattus rattus*): infrapopulation differentiation at microspatial scale. *International Journal for Parasitology*, **31**: 1609-1616.

- Silvestre, A.; Sauve, C.; Cortet, J.; Cabaret, J. 2009.** Contrasting genetic structures of two parasitic nematodes, determined on the basis of neutral microsatellite markers and selected anthelmintic resistance markers. *Molecular Ecology*, **18**: 5086-5100.
- Smeal, M. G.; Hall, C. A. 1983.** The activity of triclabendazole against immature and adult *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Australian Veterinary Journal*, **60**: 329-331.
- Smith, M. A.; Clegg, J. A. 1981.** Improved culture of *Fasciola hepatica* in vitro. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **66**: 9-15.
- Smyth, J. D.; Halton, D. W. 1983.** *The Physiology of Trematodes*. Cambridge University Press, Cambridge. UK.
- Šnáběl, V.; Hanzelová, V.; Mattiucci, S.; D'Amelio, S.; Paggi, L. 1996.** Genetic polymorphism in *Proteocephalus exiguus* shown by enzyme electrophoresis. *Journal of Helminthology*, **70**: 345-349.
- Solano, P.; de La Rocque, S.; De Meeûs, T.; Cuny, G., Duvallet, G.; Cuisance, D. 2000.** Microsatellite DNA markers reveal genetic differentiation among populations of *Glossina palpalis gambiensis* collected in the agropastoral zone of Sideradougou, Burkina Faso. *Insect Molecular Ecology*, **9**: 433-439.
- Stitt, A. W.; Fairweather, I. 1992.** Spermatogenesis in *Fasciola hepatica*: an ultrastructural comparison of the effects of the anthelmintic, triclabendazole ("Fasinex") and the microtubule inhibitor, tubulazole. *Invertebrate Reproduction and Development*, **22**: 139-150.
- Stitt, A. W.; Fairweather, I. 1993.** *Fasciola hepatica*: tegumental surface changes in adult and juvenile flukes following treatment in vitro with the sulphoxide metabolite of triclabendazole (Fasinex). *Parasitology Research*, **79**: 529-536.
- Stitt, A. W.; Fairweather, I. 1994.** The effect of the sulphoxide metabolite of triclabendazole ("Fasinex") on the tegument of mature and immature stages of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, **108**: 555-567.

- Stitt, A. W.; Fairweather, I. 1996.** *Fasciola hepatica*: disruption of the vitelline cells in vitro by the sulfoxide metabolite of triclabendazole. *Parasitology Research*, **82**: 333-339.
- Storfer, A.; Murphy, M. A.; Evans, J. S.; Goldberg, C. S.; Robinson, S.; Spear, S. F.; Dezzani, R.; Delmelle, E.; Vierling, L.; Waits, I. P. 2007.** Putting the “landscape” in landscape genetics. *Heredity*, **98**: 128-142.
- Sukhdeo, M. V.; Mettrick, D. F. 1986.** The behavior of juvenile *Fasciola hepatica*. *The Journal of Parasitology*, **72**: 492-497.
- Terasaki, K.; Moriyama-Gonda, N.; Noda, Y. 1998.** Abnormal spermatogenesis in the common liver fluke (*Fasciola* sp.) from Japan and Korea. *The Journal of Veterinary Medical Science*, **60**: 1305-1309.
- Terasaki, K.; Noda, Y.; Shibahara, T.; Itagaki, T. 2000.** Morphological comparisons and hypotheses on the origin of polyploids in parthenogenetic *Fasciola* sp. *The Journal of Parasitology*, **86**: 724-729.
- Théron, A.; Sire, C.; Rognon, A.; Prugnolle, F.; Durand, P. 2004.** Molecular ecology of *Schistosoma mansoni* transmission inferred from the genetic composition of larval and adult infrapopulations within intermediate and definitive hosts. *Parasitology*, **129**: 571-585.
- Thrall, P. H.; Burdon, J. J.; Young, A. 2001.** Variation in resistance and virulence among demes of a plant host-pathogen metapopulation. *Journal of Ecology*, **89**: 736-748.
- Torgerson, P.; Claxton, J. 1999.** Epidemiology and control. En: *Fasciolosis*. J. P. Dalton (Ed.). CABI Publishing, Wallingford. UK.
- Turner, K.; Armour, J.; Richards, R. J. 1984.** Anthelmintic efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Record*, **114**: 41-42.

- Vara del Río, M. P.; Villa, H.; Martínez-Valladares, M.; Rojo-Vázquez, F. A. 2007.** Genetic heterogeneity of *Fasciola hepatica* isolates in the northwest of Spain. *Parasitology Research*, **101**: 1003-1006.
- Vargas, D.; Vega, M.; González, C. G. 2003.** Aproximación a una caracterización de *Fasciola hepatica* por la técnica RAPDs-PCR. *Parasitología Latinoamericana*, **58**: 11-16.
- Vázquez-Prieto, S.; Vilas, R.; Mezo, M.; González-Warleta, M.; Ubeira, F.M.; Paniagua, E. 2011.** Allozyme markers suitable for population genetic analysis of *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **176**: 84-88.
- Vercruysse, J.; Claerebout, E. 2001.** Treatment vs non-treatment of helminth infections in cattle defining the threshold. *Veterinary Parasitology*, **98**: 195-214.
- Vilas, R.; Paniagua, E. 2004.** Estimation of the prevalence of outcrossing in the hermaphrodite trematode *Lecithochirium rufoviride* by allozyme analysis. *Acta Parasitologica*, **49**: 12-15.
- Vilas, R.; Paniagua, E.; Outeiral, S.; Sanmartín, M. L. 2002a.** Electrophoretic and morphological differentiation of three sympatric species of the genus *Lecithochirium* (Trematoda: Hemiuridae), parasites of marine fishes. *Parasitology Research*, **88**: 1055-1060.
- Vilas, R.; Paniagua, E.; Sanmartín, M. L. 2002b.** Quaternary structure of enzymes in trematodes of the genus *Lecithochirium*: inference from allozymic patterns. *Acta parasitologica*, **47**: 323-328.
- Vilas, R.; Paniagua, E.; Sanmartín, M. L. 2003.** Genetic variation within and among inrapopulations of the marine digenetic trematode *Lecithochirium fusiforme*. *Parasitology*, **126**: 465-472.
- Vilas, R.; Sanmartín, M. L.; Paniagua, E. 2004.** Genetic variability of natural populations of trematodes of the genus *Lecithochirium* parasites of eels. *Parasitology*, **129**: 191-201.

- Vilas, R.; Cao, A.; Pardo, B. G.; Fernández, S.; Villalba, A.; Martínez, P. 2011.** Very low microsatellite polymorphism and large heterozygote deficits suggest founder effects and cryptic structure in the parasite *Perkinsus olseni*. *Infection, Genetics and Evolution*, **11**: 904-911.
- Vilas, R.; Vázquez-Prieto, S.; Paniagua, E. 2012.** Contrasting patterns of population genetic structure of *Fasciola hepatica* from cattle and sheep: implications for the evolution of anthelmintic resistance. *Infection, Genetics and Evolution*, **12**: 45-52.
- Virkel, G.; Lifschitz, A.; Sallovitz, J.; Pis, A; Lanusse, C. 2006.** Assessment of the main metabolism pathways for the flukicidal compound triclabendazole in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **29**: 213-223.
- Walker, S. M.; Prodöhl, P. A.; Fletcher, H. L.; Hanna, R. E. B.; Kantzoura, V.; Hoey, E. M.; Trudgett, A. 2007.** Evidence for multiple mitochondrial lineages of *Fasciola hepatica* (liver fluke) within infrapopulations from cattle and sheep. *Parasitology Research*, **101**: 117-125.
- Walker, S. M.; Johnston, C.; Hoey, E. M.; Fairweather, I.; Borgsteede, F.; Gaasenbeek, C.; Prodöhl, P. A.; Trudgett, A. 2011a.** Population dynamics of the liver fluke, *Fasciola hepatica*: the effect of time and spatial separation on the genetic diversity of fluke populations in the Netherlands. *Parasitology*, **138**: 215-223.
- Walker, S. M.; Johnston, C.; Hoey, E. M.; Fairweather, I.; Borgsteede, F. H.; Gaasenbeek, C. P.; Prodöhl, P. A.; Trudgett, A. 2011b.** Potential role of hares in the spread of liver fluke in the Netherlands. *Veterinary Parasitology*, **177**: 179-181.
- Ward, R. D.; Skibinski, D. O. F.; Woodward, M. 1992.** Protein heterozygosity, protein structure, and taxonomic differentiation. *Evolutionary Biology*, **26**: 73-159.
- Weir, B. S.; Cockerham, C. C. 1984.** Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**: 1358-1370.

- Whitkus, R.; Doebley, J.; Wendel, J. F. 1994.** Nuclear DNA markers in systematics and evolution. En: *DNA-Based Markers in Plants*. R. L. Phillips y I. K. Vasil (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands.
- Wirth, T.; Meyer, A; Achtman, M. 2005.** Deciphering host migrations and origins by means of their microbes. *Molecular Ecology*, **14**: 3289-3306.
- Wolstenholme, A. J.; Fairweather, I.; Prichard, R.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Sangster, N. C. 2004.** Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*, **20**: 469-476.
- Wright, S. 1965.** The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, **19**: 395-420.
- Wu, S. G.; Wang, G. T., Xi, B. W.; Xiong, F.; Liu, T.; Nie, P. 2009.** Population genetic structure of the parasitic nematode *Camallanus cotti* inferred from DNA sequences of ITS1 rDNA and the mitochondrial COI gene. *Veterinary Parasitology*, **164**: 248-256.